

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Bodenökologie

**Untersuchungen zur epidemiologischen Entwicklung von
Fusarium sp. in Weizen während der Vegetationsperiode und
im Erntegut mit Hilfe molekularer Methoden**

Astrid Bauer

Vollständiger Abdruck der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des aka-
demischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K.-J. Hülsbergen

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. C. Munch

2. Univ.-Prof. Dr. W. Oßwald

Die Dissertation wurde am 19.12.2007 bei der Technischen Universität München einge-
reicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Land-
nutzung und Umwelt am 04.06.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Seite

Zusammenfassung	11
1 Einleitung.....	13
1.1 Bedeutung von <i>Fusarium</i> -Infektionen für die Landwirtschaft	13
1.2 <i>Fusarium</i> spp. und Weizen	13
1.2.1 Systematische Einordnung von <i>Fusarium</i> spp.	13
1.2.2 Mykotoxinproduktion von <i>F. graminearum</i>	15
1.2.3 Bedeutung von Deoxynivalenol bei der Pathogenese in Weizen.....	16
1.2.4 Vermehrungszyklus von <i>F. graminearum</i>	17
1.3 Bekämpfung von <i>Fusarium</i> spp. im Getreideanbau	19
1.3.1 Anbaumaßnahmen.....	19
1.3.1.1 Berücksichtigung örtlicher Gegebenheiten	19
1.3.1.2 Wahl der angebauten Kultur	20
1.3.2 Fungizideinsatz	21
1.3.3 Alternative Bekämpfungsmethoden.....	21
1.3.4 Prognosemodelle für den Befall mit <i>Fusarium</i> spp.	22
1.4 Nachweismethoden für <i>Fusarium</i> spp.	22
1.4.1 Nicht-molekularbiologische Methoden.....	22
1.4.2 Neuere Methoden für den <i>Fusarium</i> -Nachweis	23
1.4.2.1 Nachweis von <i>Fusarium</i> -Toxinen.....	23
1.4.2.2 Molekularer Nachweis von <i>Fusarium</i> -DNA.....	23
1.4.2.3 Gen-Expressionsanalyse.....	24
1.5 Ziel der Arbeit.....	24
1.5.1 Beschreibung des Arbeitsschwerpunktes „Mykotoxine“ an der LfL.....	24
1.5.2 Zielsetzung und Versuchansatz.....	25
2 Material und Methoden.....	28
2.1 Kultur verschiedener Pilzgattungen und -arten.....	28
2.1.1 Kulturbedingungen der Pilze.....	28
2.1.2 Nährmedien	28
2.1.3 Biologisches Material.....	28
2.2 Feldversuche	29
2.2.1 Standorte und Erfassung der Witterungsparameter.....	29
2.2.2 Auswahl der Weizensorten	30
2.2.3 Felddesign und <i>F. graminearum</i> - Inokulation auf den Versuchsflächen.....	30

2.2.4	Schema der Probennahme und -aufbereitung	31
2.3	Molekularbiologische Arbeiten.....	32
2.3.1	DNA-Extraktion und Bestimmung des DNA-Gehalts.....	32
2.3.1.1	DNA-Isolierung aus Pilz-Reinkulturen und Herstellung der DNA- Standards	32
2.3.1.2	DNA-Isolierung aus Weizenblättern.....	33
2.3.1.3	DNA-Isolierung aus Ähren	34
2.3.1.4	Bestimmung des DNA-Gehalts	35
2.3.2	RNA-Isolierung.....	35
2.3.3	Verwendete Primer und Hybridisierungs sonden	36
2.3.4	Polymerase -Kettenreaktion (PCR) und Reverse Transkriptase- Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	37
2.3.4.1	Qualitative PCR.....	37
2.3.4.2	Agarosegel-Elektrophorese	37
2.3.4.3	Analyse der PCR-Produkte	38
2.3.4.4	Realtime-PCR.....	38
2.3.4.5	RT-PCR.....	39
2.3.4.6	Relative Quantifizierung	40
2.3.5	DON-ELISA	41
2.4	Statistische Auswertung	41
2.4.1	Allgemeines zur Berechnung der Probenmittelwerte	41
2.4.2	Statistische Berechnung	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Optimierung der Nukleinsäuren-Extraktion.....	44
3.2	Primer-Testung.....	46
3.3	DNA-Gehalte von Trichothecenproduzenten gemessen mit der Realtime- PCR	48
3.4	Vergleich der zeitlichen Verläufe der Trichothecenproduzenten-DNA und der <i>F. graminearum</i> -DNA	51
3.5	Expression des <i>tri5</i> -Genes von <i>Fusarium</i> in Weizen.....	54
3.6	ELISA-Untersuchungen auf den DON-Gehalt	57
3.7	Zusammenstellung der zeitlichen Verläufe vom DON-Gehalt, der <i>tri5</i> - Expression und des Gehalts an Trichothecenbildner-DNA in Weizen.....	60
3.8	Statistische Auswertung	62
3.8.1	Korrelation der zeitlichen Verläufe.....	62
3.8.1.1	Trichothecenproduzenten-DNA	62

3.8.1.2	Trichothecenproduzenten-DNA zu <i>F. graminearum</i> -DNA.....	63
3.8.1.3	Expression des <i>tri5</i> -Genes.....	64
3.8.1.4	DON-Gehalte	64
3.8.2	Überprüfung der Signifikanz der Einflussfaktoren Standort, Sorte und Jahr auf die Befallsentwicklung.....	65
4	Diskussion	67
4.1	Untersuchungen auf <i>F. graminearum</i> - und Trichothecenproduzenten-DNA in Weizen	67
4.1.1	Nachweismethode und Vorkommen der DNA von Trichothecenproduzenten auf Weizenblättern	67
4.1.2	Vorkommen der <i>F. graminearum</i> - und Trichothecenproduzenten-DNA in Weizenähren.....	68
4.2	Bedeutung und Entwicklung des Gehalts von DON in Weizenähren.....	70
4.2.1	Anstieg des Toxingehaltes in Weizenähren	70
4.2.2	Bedeutung DONs für die Etablierung von <i>Fusarium</i> in Weizen	71
4.2.3	Zusammenhang zwischen DON-Gehalt und Anteil an <i>Fusarium</i> -DNA	72
4.3	Zeitliche Entwicklung der <i>tri5</i> -Gen-Expression von <i>Fusarium</i> in Weizenähren.....	74
4.4	Wechselwirkungen von <i>Fusarium</i> und Weizen	77
4.5	Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse für den Weizen-Anbau.....	79
4.5.1	Optimierung der Probenahme	79
4.5.2	Bewertung der DON-Bestimmung.....	80
4.5.3	Bestimmung der <i>Fusarium</i> -DNA als Frühindikation	81
4.5.4	Stand der Entwicklung von Prognosemodellen	81
4.6	Ausblick	81
5	Anhang	83
5.1	Die Wetterdaten aus den Versuchsjahren 2004 und 2005 von beiden untersuchten Standorten	83
5.2	Entwicklungsstufen von Getreide	85
5.3	Gegenüberstellung der Probennahmeterminen, der Entwicklungsstufe und der Art der Probe aus 2004 und 2005.....	87
5.4	Korrelationen der zeitlichen Verläufe <i>F. graminearum</i> -DNA und Trichothecenproduzenten-DNA.....	89
5.5	Zeitliche Zusammenhänge von DON-Gehalt, DNA-Gehalt von Trichothecenbildnern und <i>tri5</i> -Genexpression	90
5.6	Grafische Darstellungen der Tukey-Kramer-Tests	92
	Literaturverzeichnis	95

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb. 1: Darstellung von Deoxynivalenol (DON)	15
Abb. 2: Biosynthese der Trichothecene und dabei beteiligte sogenannte <i>tri</i> -Gene	16
Abb. 3: Entwicklungszyklus von <i>G. zeae</i> (<i>F. graminearum</i>) bei Weizen	18
Abb. 4: Maisstoppeln auf der Versuchsfläche (1/m ²)	30
Abb. 5: Schematische Darstellung der Probennahme auf einer Versuchsfläche	31
Abb. 6: DNA-Gehalte von Ährenproben verschiedener Entwicklungsstadien, die nach Doyle und Doyle (1990) bzw. nach dem neuen Verfahren extrahiert wurden.	44
Abb. 7: Ct-Werte in der Realtime-PCR auf das <i>tri5</i> -Gen bei Verwendung verschiedener DNA-Extraktionsverfahren.	45
Abb. 8: Realtime-PCR-Amplifizierung mit einer DNA-Probe aus BBCH 95 mit der neuen Variante extrahiert.	45
Abb. 9: Realtime-PCR-Amplifizierung mit einer DNA-Probe aus BBCH 95 mit der Original-Methode extrahiert.	46
Abb. 10: Zeitlicher Verlauf des Gehalts von Trichothecenproduzenten-DNA im Jahre 2004 in Frankendorf und Osterseeon bei `Complet`.	49
Abb. 11: Zeitlicher Verlauf des Gehalts von Trichothecenproduzenten-DNA im Jahre 2004 in Frankendorf und Osterseeon bei `Petrus`.	50
Abb. 12: Zeitlicher Verlauf des Gehalts von DNA der Trichothecenbildner im Jahre 2005 in Frankendorf und Osterseeon bei `Complet`.	50
Abb. 13: Zeitlicher Verlauf des Gehalts von Trichothecenproduzenten-DNA im Jahre 2005 in Frankendorf und Osterseeon bei `Petrus`.	51
Abb. 14: Zeitliche Verläufe des Gehalts an Trichothecenbildner-DNA und <i>F. graminearum</i> -DNA 2004 in Frankendorf bei `Complet`.	52
Abb. 15: Zeitliche Verläufe des Gehalts an Trichothecenbildner-DNA und <i>F. graminearum</i> -DNA 2004 in Frankendorf bei `Petrus`.	52
Abb. 16: Zeitliche Verläufe des Gehalts an Trichothecenproduzenten-DNA und <i>F. graminearum</i> -DNA 2005 in Frankendorf bei `Complet`.	53
Abb. 17: Zeitliche Verläufe des Gehalts an Trichothecenproduzenten-DNA und <i>F. graminearum</i> -DNA 2005 in Frankendorf bei `Petrus`.	53
Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Expression des <i>tri5</i> -Gens in Weizensorten 2004 in Frankendorf.	55
Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der Expression des <i>tri5</i> -Gens in Weizensorten 2004 in Osterseeon.	55
Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der Expression des <i>tri5</i> -Gens in Weizensorten 2005 in Frankendorf.	56
Abb. 21: Zeitlicher Verlauf der Expression des <i>tri5</i> -Gens in Weizensorten 2005 in Osterseeon.	56
Abb. 22: Die zeitlichen Verläufe der DON-Gehalte 2004 in `Complet` an beiden Standorten.	57

Abb. 23: Die zeitlichen Verläufe der DON-Gehalte 2004 in `Petrus` an beiden Standorten.....	58
Abb. 24: Die zeitlichen Verläufe der DON-Gehalte 2005 in `Complet` an beiden Standorten.....	59
Abb. 25: Die zeitlichen Verläufe der DON-Gehalte 2005 in `Petrus` an beiden Standorten.....	59
Abb. 26: Trichothecenbildner-DNA, Expression vom Gen <i>tri5</i> und DON-Gehalt in Weizen der Sorte `Complet` am Standort Frankendorf 2004.	60
Abb. 27: Trichothecenproduzenten-DNA, Expression vom Gen <i>tri5</i> und DON-Gehalt in Weizen der Sorte `Petrus` am Standort Osterseeon 2004.....	61
Abb. 28: Wetterdaten 2004 von Frankendorf und Osterseeon.....	83
Abb. 29: Wetterdaten 2005 von Frankendorf und Osterseeon.....	84
Abb. 30: Zeitliche Verläufe von Trichothecenproduzenten-DNA und <i>F. graminearum</i> -DNA in Weizen.	89
Abb. 31: Zeitliche Verläufe von DON-Gehalt, DNA-Gehalt von Trichothecenbildnern und <i>tri5</i> -Genexpression bei `Complet` und `Petrus` in Frankendorf und Osterseeon im Jahr 2004.	90
Abb. 32: Zeitliche Verläufe von DON-Gehalt, DNA-Gehalt von Trichothecenbildnern und <i>tri5</i> -Genexpression bei `Complet` und `Petrus` in Frankendorf und Osterseeon im Jahr 2005.	91
Abb. 33: Grafische Darstellung des Tukey-Kramer-Tests für die Einflussfaktoren beim Standort.	92
Abb. 34: Grafische Darstellung des Tukey-Kramer-Tests für die Einflussfaktoren beim Befall der Weizen-Sorten.	93
Abb. 35: Grafische Darstellung des Tukey-Kramer-Tests für die Einflussfaktoren in den beiden Anbaujahren.....	94

Tabellenverzeichnis

Seite

Tab. 1: Gesetzliche Grenzwerte für Deoxynivalenol in Nahrungsmitteln	13
Tab. 2: Die hauptsächlich befallenen Pflanzenbereiche bei Infektionen von Getreide mit <i>Fusarium</i> und <i>Microdochium</i>	14
Tab. 3: Auswahl toxinproduzierender Fusarien und ihrer Toxine (Rodemann und Bartels, 2004)	15
Tab. 4: Verwendete Pilzstämme und deren Herkunft.....	29
Tab. 5: Angaben zu den Versuchstandorten	30
Tab. 6: Die verschiedenen Primersysteme, Verwendung und Herkunft	36
Tab. 7: Annealingtemperatur für Realtime-PCR.....	39
Tab. 8: Die verschiedenen Primersysteme und Anzahl der getesteten Primer.....	46
Tab. 9: Übersicht über die Tests auf Spezifität der Primersysteme für <i>F. graminearum</i> und das <i>tri5</i> -Gen bei denen keine Kreuzreaktionen mit anderen <i>Fusarium</i> -Arten und <i>Microdochium</i> -Arten auftraten	47
Tab. 10: Die verwendeten Primer bzw. Gensonde, ihre Sequenzen, Länge der amplifizierten DNA-Fragmente und das korrespondierende Gen.....	48
Tab. 11: Korrelationen der zeitlichen Verläufe bei der Trichothecenproduzenten-DNA in Weizen.....	63
Tab. 12: Korrelation der zeitlichen Verläufe von Trichothecenproduzenten-DNA und <i>F. graminearum</i> -DNA in Weizen	64
Tab. 13: Korrelationen der zeitlichen Verläufe von DON-Gehalten in Weizen.....	65
Tab. 14: Übersicht über die signifikanten Einflussfaktoren auf die zeitliche Entwicklung von <i>F. graminearum</i> - und Trichothecenbildner-DNA und den DON-Gehalt.....	66
Tab. 15: Übersicht über den Termin der Probennahme, das jeweilige Entwicklungsstadium und die Probenart für Frankendorf und Osterseeon 2004	87
Tab. 16: Übersicht über den Termin der Probennahme, das jeweilige Entwicklungsstadium und die Probenart für Frankendorf und Osterseeon 2005	88

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter, 10 ⁻⁶ Liter (l)
µM	Mikromolar
A ₂₆₀	Absorbtion bei 260 nm
BBCH	Entwicklungsstufen des Getreides nach Meier et al. (2001)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
C _T	Threshold Cycle;
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Durchmesser
DAS	Diacetoxyscirpenol
dest	destilliert
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP's	Desoxynukleotide
DON	Desoxynivalenol
dt	Dezitonne, 10 ⁻¹ Tonnen (t)
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
F	Fahnenblatt bei Getreide (oberstes Blatt, unter der Ähre)
F-1	Blatt direkt unter dem Fahnenblatt bei Getreide
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatograph
h	Stunde (hora)
H ₂ O	Wasser
ha	Hektar
HPLC	High pressure liquid chromatography
Hz	Hertz, 1/s
km	Kilometer, 10 ³ m
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
m	Meter
mg	Milligramm, 10 ⁻³ g
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute

ml	Milliliter, 10^{-3} l
mm	Millimeter, 10^{-3} m
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometer
NaAcetat	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
Na-EDTA	Natrium-Ethylendiamintetraacetat
ng	Nanogramm, 10^{-9} g
NH ₄ -Acetat	Ammoniumacetat
NIR	NahesInfrarot
NIV	Nivalenol
nm	Nanometer, 10^{-9} m
NS	Niederschlag
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase chainreaction (Polymerase Kettenreaktion)
ppm	Parts per Million
PVP-40	Polyvinylpyrrolidon K-40
R ²	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
T	Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
x g	x-fache Erdbeschleunigung g
ZEA	Zearalenon

Zusammenfassung

In den gemäßigten Klimazonen gilt *Fusarium* spp. als einer der wichtigsten Krankheitserreger bei Weizen. Einige Arten dieses phytopathogenen Pilzes produzieren Toxine, wie zum Beispiel Deoxynivalenol (DON). Über die Verarbeitung von toxinhaltigem Getreide gelangen diese teilweise stark giftigen Toxine in Lebensmittel. Die europäische Union hat deshalb Grenzwerte für einige Mykotoxine festgelegt.

Um eine gezielte Bekämpfung und Abwehr gegenüber *Fusarium* spp. und dadurch eine Reduktion oder gänzliche Vermeidung der Toxine zu erreichen, werden genauere Kenntnisse über die Pilz-Pflanze-Interaktion benötigt.

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Entwicklung von *Fusarium* spp. im Weizen und die damit verbundene Toxinproduktion während der Vegetationsperiode durchgeführt. In zwei Jahren wurden an zwei verschiedenen Standorten, die sich vor allem durch die Witterung unterscheiden, zwei unterschiedlich sensitive Winterweizensorten mit Maisstängeln inokuliert. Vom Frühjahr bis zur Ernte erfolgte eine regelmäßige Beprobung der Versuchsflächen. Die Blätter und Ähren wurden mit Realtime PCR auf das Vorkommen bestimmter Toxinbildner (Trichothecen-Bildner) von *Fusarium* (DNA-Menge des *tri5*-Gens), auf die DNA von *F. graminearum*, die Expression eines für die DON-Produktion wichtigen Genes (*tri5*) und mit ELISA auf den DON-Gehalt untersucht.

Bei der Quantifizierung der DNA-Menge des *tri5*-Gens zum Nachweis von Trichothecenproduzierenden *Fusarium*-Arten bei Weizenblättern lagen die Messwerte sehr häufig unter der Nachweisgrenze, weshalb keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten.

Auf den untersuchten Ähren konnte sowohl DNA von fusariellen Trichothecenbildnern als auch *F. graminearum*-DNA quantitativ nachgewiesen werden. Die Anstiege der jeweiligen DNA-Gehalte verliefen sowohl bei den DNA-Untersuchungen von Trichothecenproduzenten, als auch bei den DNA-Untersuchungen zu *F. graminearum* ähnlich und erreichten ein nahezu identisches Befallsniveau. Daraus wurde gefolgert, dass in den untersuchten Proben *F. graminearum* der hauptsächliche Trichothecenbildner und somit auch der Hauptproduzent von DON war.

Die Art und Weise des Anstiegs der DON-Gehalte während der Vegetationsperiode bestätigte die Messungen aus anderen Arbeiten und legte die Vermutung nahe, dass DON eine entscheidende Rolle bei der Etablierung von *Fusarium* im Weizen einnimmt.

Die *tri5*-Expression wies einen Expressionspeak etwa zeitgleich zum deutlichen Anstieg des DON-Gehaltes und der DNA von Trichothecenbildnern auf. Daher scheint die Theorie stimmig, dass in *Fusarium* eine Expression des *tri5*-Gens erfolgt und anschließend der DON-Gehalt steigt. Durch die Toxinproduktion ist es für den Pilz leichter sich in der Pflanze zu etablieren, was durch den daran folgenden Anstieg der Trichothecenproduzenten-DNA bestätigt scheint.

Bei allen Untersuchungen wurde ein signifikanter Einfluss des Standortes, der Sorten und auch der Anbaujahre festgestellt. Zudem scheinen bei allen Untersuchungen die Witterung, welche sich in den Standort- und Jahres-Unterschieden wiederfindet, die Art und Weise der Probennahme auf dem Feld und die pflanzeneigene Abwehr eine Rolle bei der gemessenen Pilzentwicklung *in planta* zu spielen. Dies sollte auch bei Resistenzuntersuchungen von Winterweizen gegenüber *Fusarium* spp. berücksichtigt werden.

Um vor der Ernte bereits Informationen über den zu erwartenden Toxin-Gehalt im zu erntenden Getreide zu erhalten, wäre eine etwa 2 Wochen vor der Ernte durchgeführte Beprobung und eine anschließende Analyse auf den Trichothecenproduzenten-DNA- und DON-Gehalt sinnvoll. Aufgrund der aktuellen Datenbasis und der Verläufe des DON- und des DNA-Gehaltes der Trichothecenproduzenten in den Ähren kann derzeit keine Empfehlung für eine geeignete Vor-Ernte-Beprobung gegeben werden. Die gemessenen Unterschiede bei den Toxin- und DNA-Gehalten werden dabei in sehr starkem Maße durch die Anbaujahre, die verwendeten Sorten und die Standortbedingungen beeinflusst.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von *Fusarium*-Infektionen für die Landwirtschaft

In der Landwirtschaft verursachen Infektionen von Kulturpflanzen mit *Fusarium* spp. weltweit hohe Schäden. Zu den von *Fusarium* spp. befallenen Getreide-Arten zählen Weich- und Hartweizen, Triticale, Roggen, Hafer, Gerste, Mais und Reis. Bei den ersten sechs genannten Arten stellten Langevin et al. (2004) eine Anfälligkeit gegenüber *Fusarium* spp. in etwa der Reihenfolge (von weniger anfällig bis anfällig): Hafer < Roggen < Gerste < Triticale < Weichweizen < Hartweizen. So wird beispielsweise der Ertrag des Weizens durch die Taubährigkeit und die Produktion von Schmachtkörnern deutlich reduziert (Obst und Gehring, 2002). Zum anderen haben mit *Fusarium* belastete Körner eine schlechtere Back- und Brauqualität (Parry et al., 1995) Einige Erntepartien weisen z.T. solch hohe Toxin-Gehalte auf, dass sie damit über den festgelegten gesetzlichen Grenzwerten für Deoxynivalenol (DON) (Tab1), Nivalenol (NIV) und weitere Mykotoxine liegen und somit selbst für die Tierernährung nur noch bedingt einsetzbar sind.

Tab. 1: Gesetzliche Grenzwerte für Deoxynivalenol in Nahrungsmitteln

Auszug aus der Verordnung Nr. 1881/2006 der Kommission (EG) vom 19.12.2006	
(Quelle: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/oj/2006/l_364/l_36420061220de00050024.pdf)	
unverarbeitete Getreide außer Hartweizen, Hafer und Mais	1.250 µg/ kg
unverarbeiteter Hartweizen, Hafer und Mais	1.750 µg/ kg
für direkten Verzehr bestimmtes Getreide, Getreidemehl, Kleie und Keime	750 µg/ kg
Teigwaren (trocken)	750 µg/ kg
Brot, feine Backwaren, Kekse, Getreide-Snacks	500 µg/ kg
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	200 µg/ kg

1.2 *Fusarium* spp. und Weizen

Um auf diesen Erreger angemessen reagieren zu können, ist eine umfassende Kenntnis über den Pilz und auch den befallenen Wirt notwendig.

1.2.1 Systematische Einordnung von *Fusarium* spp.

Das Reich der Pilze umfasst unzählige Arten, die in 5 Abteilungen (Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota, Basidiomycota) eingeteilt werden. Die Pilzgattung *Fusarium* wird dabei der Abteilung der Ascomycota zugeordnet. Der Großteil der *Fusarium*-Arten zählt aufgrund unbekannter oder fehlender Hauptfruchtformen zu den

Fungi imperfecti. Für einige *Fusarium*-Arten sind die teleomorphen Formen jedoch bekannt. So stellt z.B. *Gibberella zeae* ([Schwabe] Petch) (Ascomycota, Ascomycetes, Hypocreales, Nectriaceae) die Hauptfruchtform für *F. graminearum* (Schwabe) dar. Die zahlreichen *Fusarium*-Arten sind teilweise Phytopathogene, zum Teil reine Saprophyten und auch Humanpathogene. Die phytopathogenen Arten befallen u.a. verschiedene Gemüsekulturen, Kleepflanzen, sowie diverse Zierpflanzen und Getreide-Arten und können dabei erhebliche ökologische und ökonomische Schäden verursachen (Desjardins, 2003).

Auf Getreide kommen in Süddeutschland überwiegend *F. graminearum*, *F. culmorum* ((W.G.Sm.) Sacc.), *F. poae* ((Peck) Wollenw.), *F. avenaceum* ((Fr.) Sacc.) und *Microdochium nivale* ((Fr.) Samuels I.C. Hallett), der lange Zeit zur Gattung *Fusarium* gezählt wurde, vor (Büttner, 2006). Die verschiedenen *Fusarium*-Arten und deren einzelne Stämme können sich bezüglich der Aggressivität gegenüber ihren Wirtspflanzen (Cumagun und Miedaner, 2003; Fernandez und Chen, 2005) und der klimatischen Ansprüche (Desjardins, 2003; Hope und Magan, 2003) stark unterscheiden. Daher können auch regionale Unterschiede in der Artenverteilung und im Befallsgrad auftreten. Verschiedene Arten befallen teilweise auch unterschiedliche Pflanzenorgane (Tab. 2) (Miller et al., 2002; Chelkowski, 1991).

Tab. 2: Die hauptsächlich befallenen Pflanzenbereiche bei Infektionen von Getreide mit *Fusarium* und *Microdochium*

Pilz	Pflanzenteil bei Getreide
<i>F. avenaceum</i>	Blatt, Ähre
<i>F. culmorum</i>	Halmbasis, Blatt, Ähre
<i>F. graminearum</i>	Halmbasis, Blatt, Ähre
<i>F. poae</i>	Blatt, Ähre
<i>M. nivale</i>	Halmbasis, Blatt, Ähre

Die Reihenfolge der verschiedenen *Fusarium*-Arten nach ihrer Pathogenität bei Weizen lässt sich folgendermaßen ordnen: *F. culmorum* > *F. graminearum* > *F. avenaceum* > *F. equisetii* / *F. poae* (Fernandez und Chen, 2005). Somit zählt die in dieser Arbeit näher untersuchte Art *F. graminearum* zu den stärker pathogenen Fusarien.

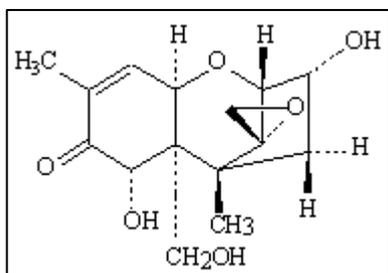
1.2.2 Mykotoxinproduktion von *F. graminearum*

Viele *Fusarium*-Arten produzieren hochwirksame Mykotoxine. Insbesondere Getreide wird von den toxinproduzierenden Arten, wie *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* und *F. avenaceum*, befallen (Tab. 3).

Tab. 3: Auswahl toxinproduzierender Fusarien und ihrer Toxine (Rodemann und Bartels, 2004)

Pilz	Toxine
<i>F. graminearum</i>	Trichothecene (DON, NIV), ZEA
<i>F. culmorum</i>	Trichothecene (DON), ZEA
<i>F. poae</i>	Trichothecene (NIV, DAS)
<i>F. avenaceum</i>	Moniliformin, Fusarin
<i>F. sporotrichioides</i>	Trichothecene (HT-2-Toxin, T-2-Toxin)

Viele der von *Fusarium* spp. gebildeten Toxine zählen zur Gruppe der Trichothecene. Al-



len Trichothecenen ist gemeinsam, dass es sich um dreizyklische Sesquiterpene mit einem 12,13-epoxytrichothec-9-ene Ring handelt. Sie werden in vier Klassen (A-D) unterteilt (Sweeney und Dobson, 1999). Von *Fusarium* spp. werden die Klassen A und B produziert. Diese

Abb. 1: Darstellung von Deoxynivalenol (DON)

beiden Klassen unterscheiden sich durch das Fehlen (Klasse A) oder das Vorhandensein (Klasse B) einer Ketogruppe an Position C-8 des Trichothecens (Nicholson et al., 2004; Rocha et al., 2005; Ichinoe et al., 1983). Zur Klasse A zählen unter anderem die Toxine Diacetoxyscirpenol (DAS), T-2 und HT-2, zur Klasse B die Toxine Deoxynivalenol (DON) und Nivalenol (NIV) (Nicholson et al., 2004; Rocha et al., 2005). Die Synthese von DON (Abb. 1) und weiteren Toxinen von Farnesyl-Pyrophosphat über Trichodiene ausgehend ist in Abb. 2 mit den Bezeichnungen einzelner beteiligter Gene dargestellt (Proctor et al., 1995; Sweeney und Dobson, 1999; Desjardins et al., 1993; Peplow et al., 2003; Toth et al., 2004; Lee et al., 2002; Kim et al., 2003). Über die gemessene Expression des *tri5*-Gens, das zu Beginn der Toxin-Synthese exprimiert wird (Abb. 2), und da von

F. graminearum und anderen bei Weizen vorkommenden fusariellen Trichothecen-Produzenten überwiegend DON gebildet wird, ist es möglich Rückschlüsse auf den späteren DON-Gehalt der Getreideprobe zu ziehen (Voigt et al., 2007; Doohan et al., 1999).

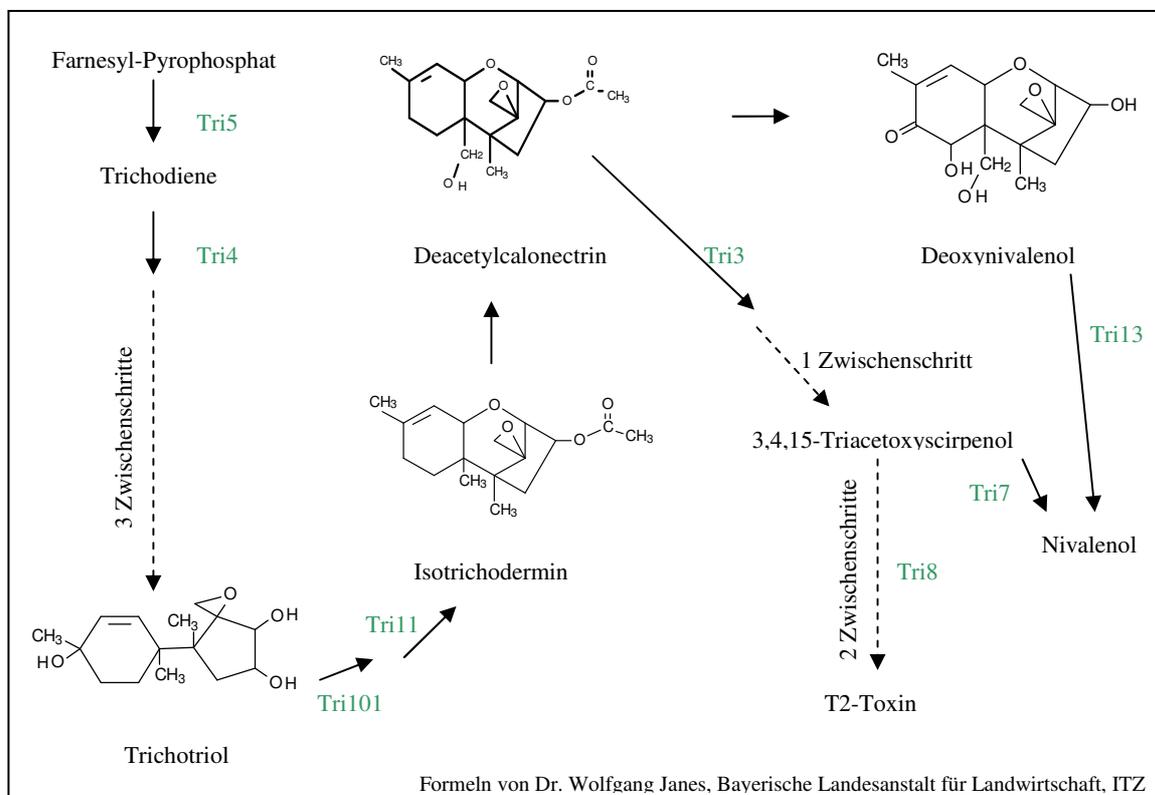


Abb. 2: Biosynthese der Trichothecene und dabei beteiligte sogenannte *tri*-Gene

DON ist, wie alle Trichothecene, sehr hitzestabil und resistent bei neutralem bis saurem pH-Wert. Daher ist es möglich, dass das Toxin im tierischen Organismus ungehindert über den Darm aufgenommen werden kann. Die toxische Wirkung (LD_{50} 0,75 mg/kg; Roth et al., 1990) von DON äußert sich in vermindertem Wachstum, Säuglingssterblichkeit, Inhibition der Proteinsynthese, Immunsuppression und Erbrechen (Rocha et al., 2005; Joffe, 1986; Diaz, 2005).

Bei Pflanzen verursacht DON eine Hemmung der Keimung und des Wachstums der Koleoptilen, sowie eine Verminderung der Wurzel- und Blattmasse (Rocha et al., 2005). Bei der Kornausbildung bewirkt DON eine Reduktion des Protein- und Glutengehaltes (Parry et al., 1995).

1.2.3 Bedeutung von Deoxynivalenol bei der Pathogenese in Weizen

Für die Aggressivität von *F. graminearum* und *F. culmorum* scheint DON eine entscheidende Rolle zu spielen (Hestbjerg et al., 2002; Ludewig et al., 2005b). Bei einem Fehlen von pilzlichen Trichothecenen konnte eine Verlangsamung und in einigen Fällen auch ein

Stopp des Pilzwachstums in der Pflanze beobachtet werden (Eudes et al., 2001). Ein Maximum der Zunahme des DON-Gehaltes in Weizen bereits drei Tage nach der Ähren-Inokulation, wird von Ludewig et al. (2005b) ebenfalls als Hinweis auf die Bedeutung DONs als Aggressivitätsfaktor betrachtet. Goswami et al. (2006) und Cumagun et al. (2004) berichteten von messbaren Mengen an DON in Gerste und Weizen bereits 48 h nach der Inokulation mit *Fusarium*. Der frühe starke Anstieg von DON spricht zudem dafür, dass DON nur zu Beginn der frühen und mittleren Phase der Wirt-Parasit-Interaktionen wichtig ist. So konnten Eudes et al. (2001) einen Zusammenhang zwischen der Produktion von Trichothecenen und dem Eindringen von *Fusarium* in die Pflanze bestätigen. Die Wirkung DONs beruht unter anderem auf einer Inhibierung der Proteinsynthese und einer Schädigung der Zellmembran. Dadurch wird das Wirtsgewebe geschwächt und die Ausbreitung des Pilzes in der Pflanze erleichtert (Ludewig et al., 2005a; Cumagun et al., 2004; Miller und Ewen, 1997). Die Pathogenabwehr scheint dadurch insgesamt geschwächt und verlangsamt (Eudes et al., 2001). Der Befallsverlauf von *Fusarium* in der Pflanze und die DON-Bildung (Ludewig et al., 2005b) sind auch in hohem Maße von Temperatur und Niederschlägen abhängig (Cumagun und Miedaner, 2003). Zudem vermuten Voigt et al. (2007), dass nicht nur DON für die Pathogenität von *F. graminearum* entscheidend ist. Zwischen den verschiedenen Getreidearten bestehen große Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit von Trichothecenen (Langevin et al., 2004). Weizen zählt dabei zu einer der Trichothecen-empfindlicheren Getreidearten.

1.2.4 Vermehrungszyklus von *F. graminearum*

Im Folgenden ist exemplarisch der Lebenszyklus von *F. graminearum* bzw. *G. zae* bei Weizen dargestellt.

Wie in Abb. 3 ersichtlich, existieren bei *F. graminearum* verschiedene Sporentypen. So bildet sich auf Ernterückständen, wie Mais- oder Weizenstoppeln, im Frühjahr ab Temperaturen über 10°C die Hauptfruchtform mit Perithezien (Pereyra et al., 2004). Innerhalb der Perithezien werden in Asci Askosporen (sexuelle Phase) gebildet. Durch hohe Luftfeuchtigkeit (De Wolf et al., 2003) oder Regenereignisse (Markell und Francl, 2003) werden die Fruchtkörper zum Platzen gebracht, die Askosporen freigesetzt und über den Wind verbreitet. Die Infektion der Ähren mit *Fusarium* spp. erfolgt in den meisten Fällen über die blühende Ähre (Narbe, Staubgefäße) durch die windverbreiteten Askosporen (Fernando et al., 1997). Zwar kann der Pilz auch andere Pflanzenorgane befallen (Stängel, selten

Blätter), der Infektionsweg über die Blüte ist jedoch am einfachsten, da bei den dünnwandigen Filamenten und den raushängenden Antheren wenig wirkungsvolle Abwehr-

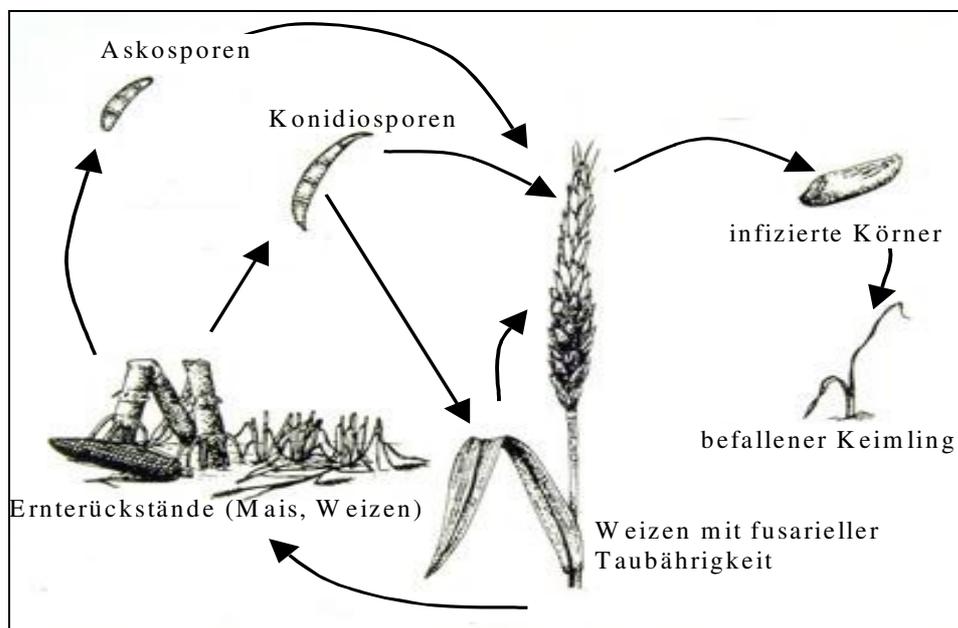


Abbildung basiert auf <http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/Fusarium/discycle.htm>

Abb. 3: Entwicklungszyklus von *G. zeae* (*F. graminearum*) bei Weizen

mechanismen von Seiten der Pflanze existieren (Rodemann und Bartels, 2004; Engle et al., 2004). Die Askosporen keimen beispielsweise nach 4 h bei 100 % Luftfeuchte und 20°C aus (Beyer und Verreet, 2005). Eine vollständige Hemmung der Keimung beobachteten Beyer et al. (2004) bei einem geringeren Wasserpotential von -65 bar (=95,3 % Luftfeuchte bei 20°C). Eine Keimung der *Fusarium*-Sporen auf Blättern führt in den seltensten Fällen zu Symptomen (Obst und Gehring, 2002). Bei Sporen von *F. graminearum* konnte gezeigt werden, dass sie bereits 6-12 h (Wanyoike et al., 2002) bzw. 24 h (Goswami et al., 2006) nach der Inokulation der Ähre über die Blüte Hyphen ausbilden können. Dabei entsteht innerhalb von 24 h ein dichtes Hyphengeflecht, woraus 24-36 Stunden nach der Infektion Penetrationshyphen gebildet werden. Nach 36 h ist der Fruchtknoten von Hyphen dicht bewachsen. Bis zu 3 Tage nach der Inokulation wächst der Pilz inter- und intrazellulär. *F. graminearum* bildet Cellulasen, Xylasen und Pektinasen, mit welchen er die Zellwand des Wirtes abbaut, und dadurch das Eindringen in die Zelle bzw. das Wirtsgewebe erleichtert. 5-6 Tage nach Inokulation sind erste Symptome, wie wässrige, braune Flecken, an der Ähre außen sichtbar. Nach Erreichen der Spindel (7-8 Tage nach der Ährchen-Inokulation) verbreitet sich *Fusarium* spp. in der Ähre. Durch die Blockade der Leitungsbahnen wird der oberhalb der Infektionsstelle liegende Ährenbereich von der Wasser- und

Nährstoff-Versorgung abgeschnitten, wodurch es zur typischen Ausprägung von Weißäh-
rigkeit ohne Kornbildung kommt. Da der Pilz basipetal wächst, breitet sich der erkrankte
Bereich in der Ähre nach unten aus und führt mit zunehmender Entwicklung der Körner
zur Bildung von Mykotoxinen und Schmachtkörnern (Rodemann und Bartels, 2004; Kang
et al., 2004 und 2005; Wanyoike et al., 2002; Parry et al., 1995). Zudem bildet sich an den
Ährchen außen ein lachsfarbener Sporenbelaag (Makrokonidien) aus (Obst und Gehring,
2002). Mittels der Makrokonidien ist es *Fusarium* spp. möglich weitere Pflanzen zu infi-
zieren.

Eine weitere Infektionsmöglichkeit besteht über Konidiosporen (Markell und Francl,
2003), welche von Ernterückständen bei Niederschlägen über Spritzwasser von Blattetage
zu Blattetage bis zur Ähre oder auch direkt bis zu dieser geschleudert werden können
(Paul et al., 2004; Adolf, 1998).

Eine Infektion ist auch während der Keimung von Weizensaatgut möglich. Einige *Fusari-
um*- Arten sind in der Lage, in der Pflanze systemisch zu wachsen (Parry et al., 1995;
Langevin et al., 2004). Ob es für den Pilz dabei möglich ist, bis in die Ähre vorzudringen,
ist jedoch fraglich. Bislang konnte dafür kein Beweis erbracht werden.

Im Boden kann *F. graminearum* in seiner saprophytischen Phase auf Ernterückständen
(Stoppeln, Körner) überleben und bei günstigen Bedingungen im nachfolgenden Frühjahr
erneut auskeimen. Die Sporen sind bis zu zwei Jahren keimfähig (Pereyra et al., 2004;
Inch und Gilbert, 2003a). Von einigen *Fusarium*-Arten, wie *F. culmorum*, *F. oxysporum*
und *F. equisetii*, können die Sporen auch direkt im Boden überdauern (Pereyra et al.,
2004; Obst und Gehring, 2002).

1.3 Bekämpfung von *Fusarium* spp. im Getreideanbau

1.3.1 Anbaumaßnahmen

1.3.1.1 Berücksichtigung örtlicher Gegebenheiten

Bei der Wahl des Standorts unter Berücksichtigung der Belastung mit *Fusarium* spp. soll-
ten sowohl topographische Gegebenheiten (möglichst keine Senken und Kuppen) als auch
die klimatische Lage (kein Kälte- oder Hitzestau, kein Waldrand mit höherer Feuchte)
berücksichtigt werden.

Eine hohe Feuchte oder Niederschläge in Verbindung mit Temperaturen über 20°C wäh-
rend der Blüte bilden günstige Infektionsbedingungen. Daher sollte auf eine Überkopfbe-

regnung verzichtet werden, um die Feuchtigkeit auf den Pflanzen und im Pflanzenbestand nicht unnötig zu erhöhen (Parry et al., 1995). Eine leichte Feuchte wirkt sich jedoch positiv auf die Aktivität der Bodenorganismen aus.

Eine angepasste Stickstoffdüngung wird empfohlen (Fauzi und Paulitz, 1994; Yi et al., 2001; Parry et al., 1995; Bartels und Rodemann, 2003), da dadurch die Pflanzen gut versorgt sind und eine vitale Pathogen-Abwehr aufweisen. Yi et al. (2001) weisen darauf hin, dass mit Kalkstickstoff die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Eine gezielte Stickstoffgabe führt zu einer Verbesserung des C/N-Verhältnisses, was einen positiven Einfluss auf die Aktivität der Mikroorganismen im Boden hat (Pereyra et al., 2004). Dadurch können wiederum die mit *Fusarium*-belasteten Ernterückstände (Pereyra et al., 2004; Inch und Gilbert, 2003a) schneller mikrobiell abgebaut werden.

Um eine gute und schnelle Zersetzung der Ernterückstände zu erreichen (Eiblmeier und Lepschy, 2007), ist auch die Art der Bodenbearbeitung wichtig. Peryera et al. (2004) empfehlen, Pflügen mit einer Zerkleinerung von Ernterückständen zu kombinieren. Durch die Zerkleinerung wird eine größere Oberfläche der Rückstände erzeugt und diese im Boden schneller von Mikroorganismen abgebaut (Inch und Gilbert, 2003a; Bartels und Rodemann, 2003). Dabei ist es jedoch wichtig, nicht zu tief zu pflügen, da dort die Aktivität der Bodenorganismen reduziert ist (Yi et al., 2001). Im ökologischen Anbau wird vom Pflugeinsatz zur Schonung der Bodenstruktur meist abgeraten. Dennoch ist der Befall mit *Fusarium* spp. und die DON-Belastung an Weizen in vielen Fällen deutlich geringer als im konventionellen Anbau (Birzele et al., 2002). Die Ursache könnte dabei in der bei ökologischem Landbau vorherrschenden aktiveren Bodenfauna liegen.

Ein weiterer Faktor ist das Vorkommen von Wildgräsern um die ackerbaulichen Kulturen. So können einige von ihnen als neue Inokulumquelle für *Fusarium* spp. dienen (Parry et al., 1995; Inch und Gilbert, 2003b).

1.3.1.2 Wahl der angebauten Kultur

Die Fruchtfolge sollte erweitert und mindestens zwei Jahre Anbaupause zwischen Weizen- und Maisanbau liegen, da die Sporen von *Fusarium* spp. bis zu 2 Jahre auf Ernterückständen, wie ausfallenden Körner, Stroh-Rückstände und Stoppeln, überleben können (Pereyra et al., 2004; Inch und Gilbert, 2003a). Auch sollten auf *Fusarium* spp. gefährdeten Flächen Weizensorten mit einer geringen *Fusarium*-Anfälligkeit angebaut werden (Bartels und Rodemann, 2003; Parry et al., 1995). Die Sorten unterscheiden sich bezüglich der

Resistenzausprägung, der Toxintoleranz und auch morphologisch. So ist oft ein deutlicher Unterschied bei der Halmlänge zu erkennen, wobei längere Pflanzen im Schnitt eine geringere Belastung mit Fusariosen aufweisen (Fauzi und Paulitz, 1994). Auch das Blühverhalten (Kang et al., 2004) unterscheidet sich in der Blühdauer (je kürzer desto geringer das Infektionsrisiko) und in der Öffnung der Ährchen zur Blüte (je weiter geöffnet, um so größer das Infektionsrisiko) (Ellner und Schuster, 2006).

1.3.2 Fungizideinsatz

Die Ausbringung der Fungizide gestaltet sich wegen des optimalen Zeitpunkts (Weizenblüte), der unterschiedlichen Ausprägung der Infektion, der unterschiedlichen Virulenz des Pathogens und der unterschiedlichen Resistenzausprägung der Pflanze schwierig (Mesterhazy et al., 2003). Es ist entscheidend zu welchem Entwicklungsstadium (Chala et al., 2003) und mit welchem Fungizid eine Behandlung erfolgt, da ansonsten lediglich eine Reduktion des Pilzwachstums, jedoch nicht des Toxingehaltes (Voigt et al., 2007) erreicht werden kann. Vielmehr gibt es Hinweise, dass sich die DON-Produktion bei erschwertem Myzelwachstum sogar erhöht. Der Einsatz von Strobilurinen wird als problematisch angesehen, da diese Fungizide bei einer Anwendung nach der vollständigen Entwicklung des Fahnenblattes (BBCH 39) eine Erhöhung des DON-Gehaltes bewirken können (Chala et al., 2003; Eiblmeier und Lepschy, 2007; Mesterhazy et al., 2003; Menniti, et al., 2003; Pirgozliev et al., 2002). Dagegen wird eine Behandlung mit Azolfungiziden empfohlen (Bartels und Rodemann, 2003; Magan et al., 2002). Durch die Ausbringung von Fungiziden kann bei *Fusarium* an Getreide bislang nur eine Befallsreduktion um etwa 70 % erzielt werden (Versuchsbericht der LfL: <http://www.versuchsberichte.de/VIPDOKVOLLPFLANZEN/DDD/4c61c.pdf>).

1.3.3 Alternative Bekämpfungsmethoden

Eine mögliche biologische Kontrolle mit Antagonisten wird diskutiert. So werden in verschiedenen Arbeiten mit unterschiedlichen Organismen (*Sporobolomyces*, *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., Actinomyzeten, *Trichoderma*-Isolaten, *Bacillus subtilis*, *Cryptococcus* sp. und *F. graminearum*-Stämmen, die nicht in der Lage sind Trichothecene zu produzieren) durchaus positive Erfahrungen gemacht (Parry et al., 1995; Cleveland et al., 2003; Koch et al., 2006; Hagn et al., 2003; Schisler et al., 2002). Da beim ökologischen Landbau ebenfalls kaum Fungizide ausgebracht werden, ist eine größere mykologische Vielfalt auf den Feldern zu finden. Das größere Potential an Antagonisten erklärt möglicherweise den geringeren Befall mit *Fusarium* an Weizen.

Um das Auftreten von *Fusarium* bei der Weizen-Keimung zu verhindern, werden mikrobielle Bekämpfungen (Koch et al., 2006) und Heißwasserdampfbehandlungen (Forsberg et al., 2005) bei Saatgut durchgeführt.

Cleveland et al. (2003) weisen zudem auf die Notwendigkeit der Insektenkontrolle hin, da diese zusätzlich als Vektor z.B. für Sporen fungieren können.

1.3.4 Prognosemodelle für den Befall mit *Fusarium* spp.

Als Hilfestellung für Getreideanbauer und -abnehmer werden derzeit von unterschiedlichen Einrichtungen Prognosemodelle erarbeitet, die versuchen die Wahrscheinlichkeit einer *Fusarium*-Infektion oder die *Fusarium*- und DON-Belastung des Erntegutes zu errechnen. Ein derartiges Modell sollte in der Lage sein, die entscheidenden Parameter für die *Fusarium*-Infektion bzw. -Entwicklung zu erfassen und diese mit den vorliegenden oder zu erwartenden Wetterdaten zu verrechnen. Wie bereits erwähnt, stellen sowohl Vorfrucht, Menge an Ausgangsinokulum, Bodenbearbeitung und Sorte, als auch die Verwendung von Fungiziden wichtige Ausgangsgrößen dar. Entscheidend ist neben den Wetterdaten (Niederschlag, Temperatur, Wind) die Entwicklung des Pilzes in bzw. auf der Pflanze. Da über letztere noch wenig bekannt ist, können bisherige Prognosemodelle (siehe Literaturverzeichnis „Internetadressen für einige *Fusarium*-Prognosemodelle“) nur mit den genannten Ausgangsgrößen in Kombination mit Wetterdaten kalkulieren.

1.4 Nachweismethoden für *Fusarium* spp.

1.4.1 Nicht-molekularbiologische Methoden

Die verschiedenen *Fusarium*-Arten können konventionell anhand ihrer Ansprüche an Wirt und Umwelt oder mikroskopisch über ihre morphologischen Merkmale unterschieden werden (Summerell et al., 2003). Zur Ermittlung des Befalls an der Pflanze wird auch die Bonitur verwendet (Edwards et al., 2001; Menniti et al., 2003).

Mit optischen Messungen im Nahen Infrarot (NIR) wird versucht bei der Getreideannahme den Gehalt an Mykotoxinen zu bestimmen (Delwiche et al., 2005).

Mit Sporenfallen, die im Feld stehen, können lediglich Aussagen über die Anzahl der windverteilten Askosporen, aber nicht über deren Keimfähigkeit, gewonnen werden (Fernando et al., 2000). Die Zuverlässigkeit dieser zeitaufwändigen und teilweise nicht ausreichend spezifischen Methoden hängt in starkem Maße von der Erfahrung und dem Ge-

schick der durchführenden Person ab (McCartney et al., 2003; Waalwijk et al., 2004; Challa et al., 2003; Summerell et al., 2003).

1.4.2 Neuere Methoden für den *Fusarium*-Nachweis

1.4.2.1 Nachweis von *Fusarium*-Toxinen

Eine Möglichkeit des DON-Nachweises ist die Verwendung der HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) (Lottspeich und Zorbas, 1998; Eiblmeier und Lepschy, 2007). Die Bestimmung des DON-Gehaltes ist auch mit anderen Formen der Chromatographie, z.B. der Gas-Chromatographie (GC) (Voigt et al., 2007) und der mit einem Massenspektrometer kombinierten GC (GC-MS) (Bakan et al., 2002), möglich. Diese Methoden weisen eine hohe Sensitivität, aber auch einen hohen instrumentellen und zeitlichen Aufwand auf.

Mit Hilfe immunologischer Analysen ist ebenfalls ein Nachweis von DON möglich. Häufig wird der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) verwendet (Doohan et al., 1999), der sich durch die Schnelligkeit des Tests und die geringere instrumentelle Ausrüstung auszeichnet. Bereits in anderen Arbeiten wurde der DON-ELISA für die Bestimmung des Toxin-Gehaltes in Pflanzenproben eingesetzt und erwies sich dabei als ausreichend sensitiv (Voigt et al., 2007; Doohan et al., 1999).

1.4.2.2 Molekularer Nachweis von *Fusarium*-DNA

Mit ELISA ist auch der immunologische Nachweis der DNA verschiedener *Fusarium*-Arten möglich (Edwards et al., 2001). Beim Nachweis von Viren mittels ELISA konnten gute Erfahrungen gemacht werden. Der Einsatz für komplexere Organismen, wie beispielsweise Pilze, ist allerdings problematisch (McCartney et al., 2003).

Für den molekularbiologischen DNA-Nachweis verschiedener *Fusarium*-Arten werden zwei unterschiedliche Methoden beschrieben. So schildern Mumford et al. (2006) sowohl den Einsatz von Microarray als auch die Verwendung der Polymerasen Kettenreaktion (PCR). Bei einem Microarray, eine reverse Dot-Blotting Methode, können verschiedene Arten parallel bestimmt werden. Die Durchführung ist schnell und effizient, bei der Unterscheidung nahverwandter Arten weist der Test jedoch Schwächen auf (Nicolaisen et al., 2005).

Die PCR (Newton und Graham, 1994) wird von zahlreichen Arbeitsgruppen bereits seit Jahren für die eindeutige Zuordnung von *Fusarium*-Arten erfolgreich eingesetzt (Hagn et

al., 2003; Beyer et al., 2004; Nicolaisen et al., 2005; Summerell et al., 2003; Nicholson et al., 1998 und 2004; Bakan et al., 2002; Edwards et al., 2001; Parry und Nicholson, 1996). Mit dieser Methode können sowohl totes als auch lebendes Myzel und Sporen aus Reinkultur und auch pflanzlichen Geweben auf unterschiedliche *Fusarium*-Arten untersucht werden (Niessen und Vogel, 1997). Mit der Realtime-PCR ist es möglich, den Anstieg des DNA-Gehaltes, teilweise mehrerer Erreger gleichzeitig, zu verfolgen und zu quantifizieren (Brandfass und Karlovsky, 2006; Waalwijk et al., 2004). Die Realtime-PCR gilt als eine der wichtigsten Methoden in der Phytodiagnose (Mumford et al., 2006; Donaldson et al., 1995; Sarlin et al., 2006; Bridge et al., 1998; Schots et al. 1994).

1.4.2.3 Gen-Expressionsanalyse

Um die Aktivität (Expression) eines Genes zu messen, gibt es verschiedene Methoden. Bei Pilzen ist die Expression nicht immer mit der Transkription identisch. Da sich jedoch in der internationalen Literatur die Bezeichnung mit Genexpression in diesem Zusammenhang etabliert hat, wird die Bezeichnung Genexpression auch in dieser Arbeit, allerdings unter Vorbehalt, verwendet. Für die Quantifizierung der Expression eignen sich im Allgemeinen der Northern-Blot, die *in situ*-Hybridisierung und der RNase protection assay. Für Untersuchungen *in planta* ist die Sensitivität dieser Methoden allerdings nicht ausreichend (Bustin, 2000; Almeida et al., 2004; Doohan et al., 1999). Für die Expressionsanalysen in der Pflanze hat sich die RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) insbesondere die Realtime RT-PCR, wegen des hohen Durchsatzes, ihrer hohen Sensitivität und ihrer hohen Reproduzierbarkeit durchgesetzt (Bustin, 2000 und 2002; Almeida et al., 2004; Voigt et al., 2007; McMaugh und Lyon, 2003).

In dieser Arbeit wird die Aktivität des *tri5*-Gens bestimmt, welches zu Beginn der Trichothecen-Synthese aktiv ist (siehe auch 1.2.2) (McMaugh und Lyon, 2003; Almeida et al., 2004).

1.5 Ziel der Arbeit

1.5.1 Beschreibung des Arbeitsschwerpunktes „Mykotoxine“ an der LfL

An der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) existiert neben weiteren Arbeitsschwerpunkten einer für „Mykotoxine“ (<http://www.lfl.bayern.de/arbeitsschwerpunkte/mykotoxine/>). Darin werden die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zusammengeführt. Ziel für den Bereich *Fusarium* ist die Entwicklung eines „Entscheidungshilfemodells zur Minimierung des *Fusarium*-Befalls und der Toxinbelastung bei Weizen“. Die

Erkenntnisse aus den Bereichen Toxin-Analytik, *Fusarium*-Diagnose (konventionell und molekularbiologisch), Agrarmeteorologie, Statistik, sowie Ergebnisse von Feldversuchen und einem *Fusarium*-Monitoring werden darin zusammengeführt. Im Rahmen dieses Arbeitsschwerpunktes entstand die vorliegende Arbeit, mit dem Fokus auf die molekulare Untersuchung des epidemiologischen Geschehens in der Pflanze. Des Weiteren beschäftigen sich einzelne Arbeitsgruppen mit Strategien zur *Fusarium*-Bekämpfung durch geeignete Fungizidbehandlung, der Züchtung *Fusarium*-resistenter Getreidesorten, der Optimierung der ackerbaulichen Faktoren und der Entwicklung eines Prognosemodells (http://www.lfl.bayern.de/ips/pflanzen_schutzhinweise/12410/).

1.5.2 Zielsetzung und Versuchansatz

Im Zuge dieser Arbeit wurden Daten über den Anstieg von *Fusarium*-DNA in Weizen während der Vegetationsperiode vom Erscheinen des Fahnenblattes (BBCH 37) bis zur Ernte gewonnen. Zusätzlich wurden die Expression eines Schlüsselgens für die Toxinsynthese und die DON-Gehalte von Beginn der Ährenblüte (BBCH 64) bis zur Ernte untersucht. Dadurch war es möglich Informationen über die Entwicklung des Pilzes in der Pflanze unter natürlichen Bedingungen zu erhalten. Aufgrund dieser Daten können weitere Rückschlüsse über die Einflüsse von Weizensorte, Standort und auch Wettereinflüsse in den verschiedenen Anbaujahren auf den zu erwartenden Toxingehalt im Erntegut gezogen werden.

Thesenformulierung

Für die Zuarbeitung zu einem in der Entwicklung befindlichen Prognosemodells (siehe 1.3.4 und 1.4) war es im Rahmen dieser Arbeit wichtig mehr Informationen über das Zusammenspiel *Fusarium*-Weizen während der Vegetationsperiode zu erhalten. Dabei wurden folgende Thesen untersucht:

- Die Menge an *Fusarium* nimmt in den befallenen Weizenähren während der Vegetationsperiode kontinuierlich zu.
- DON wird nur zur Etablierung des Pilzes in der Pflanze benötigt.
- Die Gen-Expression spiegelt den erhöhten Bedarf an DON zu Beginn der Pathogenesewider.
- *Fusarium* reagiert während der Entwicklung in den Ähren auf Umweltfaktoren und die Abwehrreaktionen der Pflanze.

- Der Hauptinfektionsweg erfolgt bei *Fusarium* über die Ähren und nicht über die Blätter.

Versuchsansatz

Durch einen geeigneten Versuchansatz wurde versucht die oben genannten Thesen zu bestätigen:

Zur Messung einer möglichen Zunahme an *Fusarium* in Weizen, wurde der *Fusarium*-DNA-Gehalt von Trichothecenbildnern und *F. graminearum* in den Ähren vom Ende des Ährenschiebens bis zur Ernte mit der Realtime-PCR quantitativ bestimmt. Mit der Messung der *Fusarium*-DNA können sowohl Myzel als auch Pilzsporen erfasst werden.

Mit einer ELISA-Messung des DON-Gehalts vom Ende des Ährenschiebens bis zur Ernte kann der Anstieg des Toxingehalts in den Ähren festgestellt werden. Durch die parallele quantitative Bestimmung der Expression des *tri5*-Gens, eines Schlüsselgens bei der DON-Synthese, mit einer Realtime-PCR zur gleichen Zeit, kann ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Toxinproduktion und Gen-Expression hergestellt werden. Durch Hinzunahme der gemessenen Gehalte an *Fusarium*-DNA können Rückschlüsse auf die Entwicklung des Pilzes in Verbindung mit der Toxin-Produktion und dem tatsächlichen Toxingehalt gezogen werden.

Um eine Aussage über den möglichen Einfluss von Weizen-Sorte, Standort und Anbaujahr auf den Verlauf der *Fusarium*-Infektion und der Toxin-Produktion treffen zu können, wurden an 2 klimatisch unterschiedlichen Standorten 2 Weizen-Sorten unterschiedlicher Anfälligkeit in zwei Jahren angebaut. Dadurch kann ein Eindruck über den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entwicklung des Pilzes in der Pflanze gewonnen werden. Dabei wird die Epidemiologie des Pilzes sowohl direkt durch die Umwelt als auch indirekt über den auf die Umwelt reagierenden Wirt beeinflusst.

Zur Klärung des Hauptinfektionsweges von Trichothecenproduzierenden *Fusarium*-Arten bei Weizen wurden zusätzlich zu den Ähren die beiden oberen Blattetagen mit Realtime-PCR quantitativ auf *Fusarium*-DNA hin untersucht.

Zwar gibt es zu einigen Punkten bereits publizierte Arbeiten, jedoch beschränken sich diese auf wenige Aspekte und beachten nicht das Zusammenspiel verschiedener Faktoren.

Bei der Bearbeitung dieser Thesen war stets auch die Anwendbarkeit und die Relevanz der Ergebnisse für die Praxis im Vordergrund. So war es von großem Interesse, ob eine Me-

thode eine Toxin-Prognose vor der Ernte ermöglicht. Gerade die Getreideabnehmer, wie Mühlen und Lagerhäuser, sind sehr daran interessiert schon vor der Ernte zu erfahren, wie die Belastung in einem Jahr ausfällt. Dadurch können diese angemessen reagieren und unter Umständen verstärkt kontrollieren. Aber auch für die Landwirte ist eine frühzeitige Warnung wichtig, da sie bei Bedarf die geeigneten Fungizide zum geeigneten Zeitpunkt einsetzen können. Somit könnten Fungizidanwendungen und Treibstoff eingespart werden.

2 Material und Methoden

2.1 Kultur verschiedener Pilzgattungen und -arten

2.1.1 Kulturbedingungen der Pilze

Für die Kulturführung der *Fusarium*-Arten und -Stämme sowie für *Microdochium nivale* wurden geeignete Nährmedien verwendet. Die Pilze wurden bei Raumtemperatur kultiviert bzw. bei Bedarf zur Beschleunigung des Wachstums auf den Nährmedien in einen Brutschrank bei gleichbleibenden 22°C gegeben.

2.1.2 Nährmedien

Zur Anzucht der Pilze wurde das Möhrenschnitzel-Nährmedium verwendet. Die weitere Kultur der Pilze erfolgte auf einem Biomalz-Agar. Die verwendeten Nährmedien wurden jeweils 20 min bei 120°C dampfdrucksterilisiert und anschließend mit sterilfiltriertem Streptomycinsulfat versetzt.

Möhrenschnitzel-Nährmedium

50 g geraspelte, rohe, gut geputzte Möhren
8 g Agar-Agar
Aqua dest. ad 500 ml
80 ppm Streptomycinsulfat

Biomalz-Nährmedium, pH 5,8-6,2

16 g Biomalz
12,5 g Agar-Agar
Aqua dest. ad 800 ml
80 ppm Streptomycinsulfat

2.1.3 Biologisches Material

Für die Herstellung von DNA-Standards (siehe 2.3.1.1) und zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Primer wurden *Microdochium nivale* und verschiedene *Fusarium*-Arten und -Stämme in Reinkultur angezogen.

Die Herkunft der unterschiedlichen Pilz-Stämme war verschieden. So stammte ein Teil aus dem langjährigen laufenden bayernweiten *Fusarium*-Monitoring der LfL. Die übrigen eingesetzten Stämme wurde der bereits bestehenden LfL-Stammsammlung (Büttner, LfL) entnommen (Tab. 4).

Tab. 4: Verwendete Pilzstämme und deren Herkunft.

Pilz	Bezeichnung	Herkunft	
		Fusarium-Monitoring	LfL-Stammsammlung
<i>F. avenaceum</i>	ER 91		X
<i>F. culmorum</i>	ER 156		X
	180	X	
	R79	X	
	158	X	
	157	X	
<i>F. graminearum</i>	ER 334 a		BBA-Stamm 69733
	ER 332 a	X	
<i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	ER 71 a	X	
<i>F. poae</i>	ER 306	X	
<i>F. pseudograminearum</i>	109948/192		CBS
<i>M. nivale</i>	ER 61 a		Stamm 34
	ER 46 a		Stamm 36

ER = Erdröhrchen (Lagerungsform), BBA-Stamm: ursprünglich von der Biologischen Bundesanstalt; CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, NL.

2.2 Feldversuche

2.2.1 Standorte und Erfassung der Witterungsparameter

An zwei Standorten in Frankendorf (48°03'54" nördliche Breite/ 11°55'08" östliche Länge) und Osterseeon (48°20'58" nördliche Breite/ 11°58'51" östliche Länge) wurden in den Jahren 2004 und 2005 jeweils zwei Winterweizen-Sorten auf je einem halben Hektar angebaut. Die beiden Standorte befinden sich in einem Abstand von 42 km und unterscheiden sich sowohl hinsichtlich der langjährigen Niederschlagsmengen als auch der Bodenart. Der Standort Frankendorf liegt etwa 50 km nordöstlich und Osterseeon 30 km östlich von München. Genauere Angaben zu den beiden Standorten sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Die Versuchsflächen befinden sich in unmittelbarer Nähe zu Messstationen des agrarmeteorologischen Messnetzes der LfL. An beiden Standorten wurden die Witterungsparameter wie Windgeschwindigkeit, Niederschlag, Temperatur usw., aufgezeichnet und stehen via Internet (www.LfL.bayern.de) zur Verfügung (siehe 5.1).

Tab. 5: Angaben zu den Versuchstandorten

Standort	langjähriges Temperatur- Mittel	langjähriges Niederschlags- Mittel	Höhe über dem Meeres- spiegel	geologische Formation	Bodenart
Frankendorf	7°-8°C	800-900 mm/Jahr	455 m	Erdinger Altmoräne	sandiger Lehm sL
Osterseeon	7°-8°C	1000-1400 mm/Jahr	560 m	Jungmoräne d. Inn- Chiemsee- Salzachgletschers	schluffiger Sand Su IV

2.2.2 Auswahl der Weizensorten

In den Versuchsjahren 2004 und 2005 wurden die Winterweizensorten 'Petrus' und 'Complet' angebaut. 'Petrus' gilt als wenig *Fusarium*-anfällige Sorte und wurde 2006 vom Bundessortenamt mit einer '2' bezüglich ihrer Anfälligkeit für Ähren-Fusariosen eingestuft. Für die Sorte 'Complet' existiert keine derartige Einstufung des Bundessortenamtes. Jedoch ist diese Sorte als EU-Sorte zugelassen und etwa mit '6' als relativ hochanfällig eingruppiert (Zimmermann mündl., 2006).

2.2.3 Felddesign und *F. graminearum*- Inokulation auf den Versuchsflächen

In dem jeweils halben Hektar pro Sorte wurde ein Fläche von 30 m x 30 m als eigentliche Versuchsfläche abgesteckt. Um eine gleichmäßige Inokulation der Versuchsflächen



Abb. 4: Maisstoppeln auf der Versuchsfläche (1/m²)

sicherzustellen und um die Daten der verschiedenen Sorten, Standorte und Anbau-Jahre vergleichen zu können, wurden im Frühjahr, ab Mitte der Bestockung (BBCH 25) (Meier,

2001), eine 20 cm lange Maisstoppel/m² als Inokulum ausgebracht (Abb. 4). Das entsprach in etwa einer Oberflächenbedeckung mit Maisstoppeln von 2 % (Kreitmayr mündl., 2005). Die BBCH-Stufen beschreiben die Entwicklungsphasen des Getreides (siehe 5.2). Die Maisstoppeln stammten aus dem jeweils letztjährigen Anbau und waren natürlich mit *F. graminearum* infiziert. Die Lagerung erfolgte während des Winters im Freien. Um die Entwicklung von *Fusarium* auf den Stoppeln zu verfolgen, wurden nach dem Ausbringen wöchentlich je Standort eine Stoppel mikroskopisch auf die Bildung von Perithezien und Askosporen untersucht.

2.2.4 Schema der Probennahme und -aufbereitung

Die Probennahme erfolgte in 2004 und 2005 zweimal pro Woche, stets an den gleichen Wochentagen in 3-4 tägigem Abstand. Die Probennahme-Termine und das entsprechende Entwicklungsstadium vom Weizen sind im Anhang (5.3) einzusehen. Je nach Entwicklungsstand wurden die Blattetagen F und F-1 und die Ähren beprobt. Die Probennahme begann ab dem Erscheinen des Fahnenblattes (BBCH 37) und endete mit der Ernte. Auf den abgesteckten Flächen (siehe 2.2.3) wurden pro Probennahmetermin jeweils 10 Mischproben genommen. Jede Mischprobe setzte sich aus 10 zufällig gezogenen Blättern oder Ähren aus allen zehn Teilflächen der abgesteckten Fläche zusammen. Die Versuchsfläche wurde 10 mal durchschritten. Dabei wurden jedes Mal von jeder der 10 Teilflächen jeweils 1 Blatt bzw. Ähre entnommen und diese zu einer Mischprobe zusammengefasst (Abb. 5).

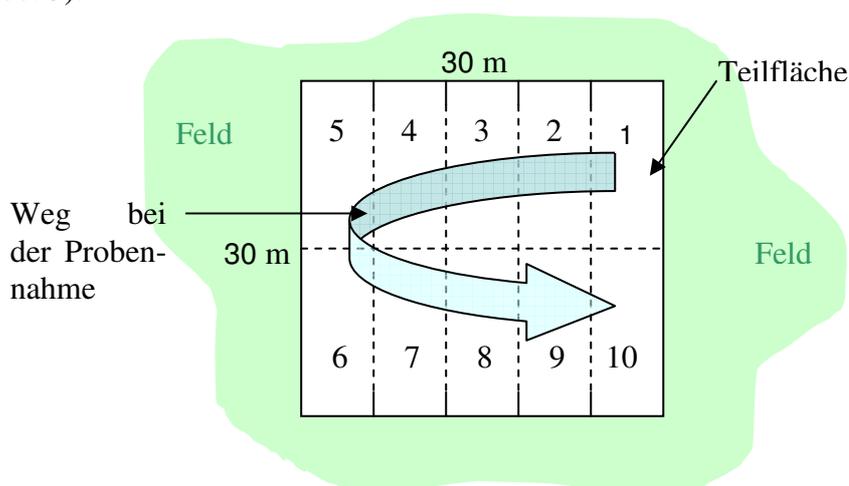


Abb. 5: Schematische Darstellung der Probennahme auf einer Versuchsfläche

Um die DNA und besonders die RNA vor zellulären Abbauprozessen zu schützen, wurden die Proben noch auf dem Feld mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, ins Labor transportiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Die gefrorenen Proben wurden anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert, um den Abbau der Nukleinsäuren zu verhindern (Huguette et al., 2000; Waalwijk et al., 2004). Die Dauer des Trocknungsvorganges richtete sich nach Art der Proben: Blätter benötigten etwa 24 h, Ähren ungefähr 48 h. Die getrockneten Proben wurden in Plastikbeutel mit Trockengel überführt, diese verschweißt und in einem dunklen und kühlen Raum gelagert.

Die getrockneten Proben wurden in einer Kugel-Schwingmühle (Retsch, MM2000) mit einer Stahlkugel ($d = 20\text{ mm}$) bei höchster Frequenz für 2-4 min pulverisiert. Im Gegensatz zu Blattproben, die direkt pulverisiert wurden, mussten die Ähren einer Vorbehandlung unterzogen werden. Diese unterschied sich nach Entwicklungsstufen (BBCH), da sich bei den jungen Ähren die Körner kaum von der Spelze trennen ließen: bis etwa frühe Milchreife (BBCH 74) wurden die getrockneten Ähren in der Tüte grob zerkleinert, wenn möglich die Spindel entfernt und dann vermahlen. Ab der mittleren Milchreife (BBCH 75) wurden die Ähren mit Mörser und Pistill grob bearbeitet, um dadurch die Körner vom Rest der Ähre zu trennen und nur die Körner zu vermahlen.

Die gemahlene Proben wurden in Rollrand-Gläser gefüllt, diese mit Parafilm verschlossen, in Tüten luftdicht verpackt und in einem kühlen und dunklen Raum aufbewahrt.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1 DNA-Extraktion und Bestimmung des DNA-Gehalts

Zur DNA-Isolierung aus Myzel, gemahlene Blättern und Ähren wurden verschiedene Methoden angewendet. Der Grund dafür lag in der unterschiedlichen Zusammensetzung (Stärke-, Protein-, Salzgehalt) der verschiedenen Matrices, die eine unterschiedliche Vorgehensweise notwendig machte. Folgende Protokolle haben sich im Hinblick auf Schnelligkeit und Effizienz als optimal herausgestellt.

2.3.1.1 DNA-Isolierung aus Pilz-Reinkulturen und Herstellung der DNA-Standards

Die DNA-Extraktion aus pilzlichen Reinkulturen von Nährmedien-Platte erfolgte mit dem DNeasy Plant Minikit von Qiagen (Hilden) nach folgendem Protokoll:

1. Etwa eine Spatelspitze Myzel (2-4 Wochen alt) wurde vom Nährmedium mit einem Spatel steril entnommen (möglichst ohne Agar) und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
2. 100 µl Puffer-AP1 und 2 Wolframcarbid-Kügelchen (d = 3 mm) wurden dazugegeben und das Reaktionsgefäß für 30 s bei 30 Hz in der Schwingmühle (Retsch, MM2000) geschüttelt.
3. Weitere 300 µl Puffer-AP1 wurden hinzugefügt und durch leichtes Schwenken das Homogenat vereint. Alles wurde kurz gemischt, in ein Magnetrack gesetzt und das Homogenat vollständig ohne die Kügelchen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend wurde gemäß dem Herstellerprotokoll verfahren und zuletzt die DNA mit 2 x 50 µl sterilem H₂O eluiert.

Um eine ausreichende Menge desselben DNA-Standards für die gesamten PCR-Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurden mindestens 30 Extraktionen der verschiedenen Reinkulturen durchgeführt. Zur Herstellung einer einheitlichen Standardlösung wurde wie folgt weiterverfahren:

1. Die Hälfte der eluierten DNA-Proben (z.B. 15 DNA-Extrakte à 100 µl von 30) wurden mit dem doppelten Volumen Isopropanol (z.B. 100 µl DNA-Extrakt + 200 µl Isopropanol) vermischt und für mindestens 1 h in -20°C gelagert.
2. Danach wurden die Proben für 10 min bei 17.000 x g zentrifugiert und der Überstand vom Pellet abgenommen.
3. Das Pellet im Reaktionsgefäß wurde im Trockenschrank bei 28°C getrocknet und anschließend in 10 µl H₂O steril gelöst.
4. Die so aufkonzentrierten Proben der verschiedenen Reinkulturen wurden mit den nicht aufkonzentrierten Proben vereinigt und photometrisch die DNA-Konzentration bestimmt (siehe 2.3.1.4).

Die so hergestellten Standardlösungen der einzelnen *Fusarium*-Arten und von *Microdochium nivale* dienten bei der PCR als Positiv-Kontrollen und wurden für die Untersuchungen von Kreuzreaktionen bei den spezifischen PCR-Systemen verwendet. Zudem wurde aus den Standardlösungen für die Standardreihen bei der quantitativen PCR definierte Verdünnungen in sterilem Wasser hergestellt, so dass Endkonzentrationen von $3,3 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/ml}$, $3,3 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/ml}$, $3,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ und $3,3 \cdot 10^{-4} \mu\text{g/ml}$, jeweils pro ml DNA-Extrakt Pilz, erhalten wurden.

2.3.1.2 DNA-Isolierung aus Weizenblättern

Die DNA-Isolierung bei Weizenblättern wurde mit dem MagAttract 96 DNA Plant Core Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Zur Einhaltung der vorgeschriebenen Inkubationszeiten wurde maximal eine halbe Mikrotiterplatte bearbeitet. Die Zelllyse erfolgte in folgenden Schritten:

1. 10 mg Trockenmasse der gemahlene Blättern wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen.
2. Dazu wurden 300 µl Buffer RLT gegeben, gründlich geschüttelt und anschließend 20 s bei höchster Geschwindigkeit gevortext.
3. Die Reaktionsgefäße wurden bei 6000 x g für 5 min zentrifugiert.

Anschließend erfolgte die Extraktion gemäß dem Herstellerprotokoll „Manual DNA Purification“.

2.3.1.3 DNA-Isolierung aus Ähren

Aufgrund des hohen Stärke- und Eiweißgehalts der Ähren (Kübler, 1994) haben sich bei der Verwendung einiger kommerziell erhältlicher Kits Schwierigkeiten ergeben. Durch die unten beschriebene Kombination von Silicamembran-Säulchen (Promega, Mannheim) und der Methode nach Doyle und Doyle (1990) konnte ein zufriedenstellendes Resultat erzielt werden. Zur Reduktion des Kontaminationsrisikos wurden in den Schritten 10-15 die Silicamembran-Säulchen in jeweils neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße ohne Deckel gesetzt.

1. 10 mg Trockenmasse der gemahlene Ähren wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingewogen.
2. Dazu wurden 2 Wolframcarbid-Kügelchen und 1 ml Doyle-Puffer gegeben und in die Kugel-Schwingmühle (Retsch, MM2000) für 30 s bei 30 Hz gespannt.
3. Die Kügelchen wurden mit dem Magnet-Rack fixiert und die Lösung in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt.
4. Anschließend wurde die Lösung 30 min bei 60°C und 800 rpm in einem Thermomixer inkubiert.
5. Nach kurzer Zentrifugation (10 s, 1500 x g) wurden 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) dazugegeben und 5 x umgeschüttelt.
6. Danach wurde die Probe 10 min bei 20°C und 5000 x g zentrifugiert.
7. 100 µl NaAcetat (3M, pH 5,2) wurden in einem neuen Reaktionsgefäß vorgelegt.
8. Die obere Phase wurde in das neue Reaktionsgefäß überführt.
9. Dazu wurden 1 ml Isopropanol (-20°C) gegeben und die Probe für mindestens 1 h in -20°C gelagert.
10. Danach wurde nach und nach die gesamte Isopropanol/Probenmischung in max. 500 µl Portionen auf ein Silicamembran-Säulchen (in neuem Reaktionsgefäß sitzend) aufgetragen und 1 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde stets - wie auch in den Folgeschritten - verworfen.
11. Anschließend wurden 500 µl Waschpuffer auf das Silicamembran-Säulchen gegeben und dieses 1 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert.
12. Dieser Waschschrift wurde wiederholt.
13. 500 µl Ethanol (4°C) wurden auf das Silicamembran-Säulchen aufgetragen und 1 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert.
14. Auch dieser Schritt wurde wiederholt.
15. 400 µl Ethanol (4°C) wurden auf das Silicamembran-Säulchen aufgetragen und 5 min bei 16.000 x g und 4°C zum Trocknen zentrifugiert.
16. Das Silicamembran-Säulchen wurde in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, 50 µl steriles H₂O auf das Säulchen aufgetragen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu-

letzten wurde durch 2 min Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C das Eluat mit der darin gelösten DNA gewonnen.

Doyle-Puffer, pH 8,0

2 % CTAB
1,4 M NaCl
100 mM Tris
20 mM Na-EDTA
1 % PVP-40
0,2 % Beta-Mercaptoethanol

Wasch-Puffer, pH 7,7

76 % Ethanol
10 mM NH₄-Acetat

2.3.1.4 Bestimmung des DNA-Gehalts

Zur Ermittlung der Konzentration der isolierten DNA, wurde mit einem Spektralphotometer (GeneQuant II, Pharmacia) die Absorption im Eluat bei 260 nm ($A_{260} = 1$ entspricht 50 ng DNA/ml) gemessen. Die Reinheit der DNA wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm/280 nm abgeschätzt, sowie über die Extinktionswerte bei 230 nm und 320 nm. Die Messung bei 320 nm wurde auch zur Kompensierung des Hintergrundsignals verwendet. Als Referenz diente steriles H₂O, das auch zur Verdünnung des DNA-Extraktes für die Messung eingesetzt wurde.

2.3.2 RNA-Isolierung

Für die Extraktion der RNA aus Ährenproben und Weizenblättern wurde der Purescript RNA Isolation Zell- und Gewebe-Kit von Gentra (Biozym, Hessisch-Oldendorf) eingesetzt. Zu Beginn der Extraktion wurde nach folgenden Schritten verfahren.

1. Für den Zellaufschluß wurden 10 mg gemahlene, trockene Pflanzenmaterial in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 2 Wolframcarbid-Kügelchen (d = 3 mm) gegeben.
2. Dazu kamen 300 µl Cell Lysis Solution.
3. Der Aufschluss erfolgte in einer Schwingmühle (Retsch, MM2000) für 30 s bei 30 Hz.
4. 100 µl Protein-DNA Precipitation Solution wurden zugegeben.
5. Das Reaktionsgefäß wurde in ein Magnet-Rack gesetzt und die Lösung in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt

Ab Schritt 5 wurde weiter nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

DNase-Verdau

Zur DNase-Behandlung wurde die RQ1 DNase von Promega (Mannheim) verwendet. Zu 24 µl RNA-Lösung wurden 3 µl RQ1 Puffer und 3 µl RQ1 Enzym-Lösung gegeben und

30 min lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 3 µl Stop Solution hinzugefügt und bei 65°C für 10 min inkubiert. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80°C.

2.3.3 Verwendete Primer und Hybridisierungs sonden

Für die qualitativen und quantitativen PCR-Untersuchungen der verschiedenen *Fusarium*-Arten wurden nach Primer-Vergleichsexperimenten und Sequenzanalysen zur Abschätzung eventueller Kreuzreaktionen und Homologien (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>, http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) die in Tab. 10 aufgeführten Primer verwendet. Die *Fusarium*-spezifischen Primer entsprachen den Angaben in der Literatur (Tab. 6).

Tab. 6: Die verschiedenen Primersysteme, Verwendung und Herkunft

`+'= wird angewendet, `+S`= Sonde. Falls nicht anders angegeben, wurde bei der quantitativen PCR SYBRGreen I verwendet.

Primer-Systeme	qualitative Anwendung	quantitative Anwendung	Ursprung und Anpassung der eingesetzten Primer bzw. Amplifikate
Pilz /Gene			
<i>F. graminearum</i>		+ S	original, Reischer <i>et al.</i> , 2004
<i>tri5</i> -Gen	+	+	original, Schnerr, 2002
<i>bt2</i> -Gen	+	+	original, Doohan <i>et al.</i> , 1999
GAPDH- in Weizen	+		original, Burton <i>et al.</i> , 1999

Vor der Verwendung des Housekeeping-Genes *beta tubulin2 (bt2)* wurde mit gesunden Weizenblattproben kontrolliert, ob das Primerpaar Bt2a/b nicht doch auch pflanzliche cDNA detektiert. Es ist unvermeidbar, dass pflanzliche cDNA oder auch DNA während der Extraktion mitisoliert werden. Daher war eine Kontrolle auf eine eventuelle Kreuzreaktion mit Weizen notwendig.

Für die Expressionsanalyse diente das *bt2*-Gen als interne Kontrolle. Es wurde als Referenz zur Kompensation möglicher, auch methodisch bedingter Unterschiede zwischen den Proben, wie Gesamt-RNA-Gehalt, Effizienz der RNA-Extraktion, DNase-Behandlung, RT-Reaktion und PCR, verwendet. Das entsprechende Primerpaar (Doohan, 1999) ist in

Tab. 6 dargestellt. In Vorversuchen wurde zur Überprüfung der Extraktion intakter, für RT-PCR geeigneter RNA GAPDH-spezifische Primer (Tab. 6) eingesetzt.

In der Realtime PCR (siehe 2.3.4.4) wurden für den Nachweis von *F. graminearum* die von Reischer et al. (2004) entwickelte Gensonde eingesetzt (Tab. 6). In allen anderen Fällen wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen I verwendet (siehe 2.3.4.4).

2.3.4 Polymerase -Kettenreaktion (PCR) und Reverse Transkriptase- Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

2.3.4.1 Qualitative PCR

GAPDH

In Vorversuchen wurde zur Überprüfung der Extraktion intakter RNA und zur Etablierung eines effektiven Systems für die RT-Reaktion mit den Primern für die GAPDH gearbeitet. Die Funktion der RNA-Isolierung mit angeschlossener cDNA-Synthese wurde mit den Primern für die GAPDH in Weizen überprüft. Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 µl mit 0,1 mM dNTP's (dNTP-Set 1, Roth, Karlsruhe), je 1 µM der Primer GAPDH-F und GAPDH-R, 1,5 mM MgCl₂, PCR Puffer (1 x), 0,5 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) und 0,5 µl cDNA-Template durchgeführt.

Das Temperaturprofil für den Thermocycler PTC 100 (MJ Research inc., Waltham (MA), USA) war wie folgt: Zur Denaturierung einmalig 94°C für 2 min, 34 Zyklen 94°C für 40 s, 60°C für 40 s und 72°C für 1 min und zum Abschluss einmalig für 5 min 72°C.

2.3.4.2 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurde ein 2 % -iges Agarosegel in 1 x TAE Puffer verwendet. Zur Färbung der DNA Fragmente wurde Ethidiumbromid eingesetzt, das vorab in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml der Gellösung zugesetzt worden war. 10 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl Ladungspuffer gemischt und davon 9 µl auf das Agarosegel aufgetragen. Als Standard diente die 100 bp-DNA-Leiter, äquimolar (Roth, Karlsruhe). Nach einer Laufzeit von etwa 1,5 h bei 80 V in TAE 1 x-Puffer, wurde das Gel auf einen Transilluminator gegeben, mit UV-Licht durchstrahlt und mit einer Digitalkamera (RA 2, Kaiser) fotografiert.

TAE -Puffer 50 x, pH 8,0

242 g Tris (2M)

57,1 ml Eisessig (1 M)

37,23 g Na-EDTA x 2H₂O (0,1M)

Aqua dest. ad 1000 ml

Ladungspuffer 6 x

1 x TAE-Puffer

0,25 % Bromphenolblau (w/v)

40 % Saccharose (w/v)

2.3.4.3 Analyse der PCR-Produkte

PCR-Produkte, die in den ersten Versuchen mit den in Tab. 6 dargestellten Primer amplifiziert wurden, wurden zur Überprüfung der Spezifität der durchgeführten PCR sequenziert. Zunächst wurden die PCR-Amplifikate aus dem PCR-Ansatz isoliert. Dazu wurden die Fragmente von vier PCR-Parallelproben mit dem PCR Clean up Kit von Qiagen (Hilden) aufgereinigt:

Puffer PB wurde im Verhältnis 5:1 (500 µl Puffer zu 100 µl PCR Amplifikat) zu den zusammengeführten Parallelproben gegeben.

Anschließend wurde gemäß dem Hersteller-Protokoll verfahren.

Die Sequenzierung der isolierten PCR-Produkte wurde von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) vorgenommen.

2.3.4.4 Realtime-PCR

DNA-Standard

Als DNA-Standard für die absolute Quantifizierung in der qualitativen PCR diente die nach Abschnitt 2.3.1.1 hergestellte Standardlösung der jeweiligen *Fusarium*-Art. Diese wurde unverdünnt und in 4 weiteren Dezimalverdünnungen (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), die jeweils frisch in sterilem Wasser hergestellt wurden, eingesetzt. Die Konzentration der unverdünnten Standards lag bei etwa 3,3 µg/ml DNA-Extrakt, Pilz (siehe 2.3.1.1). Bei jedem PCR-Lauf wurden zwei Standardreihen mit jeweils doppelt aufgetragenen Verdünnungsstufen eingesetzt. Über die geräteeigene Software (ABI Prism 7000- SDS v1.2) wurde mit den gemessenen C_T -Werten der Verdünnungen die Steigung der Standardreihe (Standardgerade) berechnet.

Die Berechnung der DNA-Quantität der einzelnen Proben erfolgte über die Standardgerade.

tri5-Gen und *bt2*-Gen

Für das *tri5*-Gen und das *bt2*-Gen wurde ein einheitliches Realtime-PCR Protokoll angewendet, bei dem lediglich die Annealing-Temperatur unterschiedlich war (Tab. 7).

Das Temperaturprofil war wie folgt: einmalig 95°C für 15 min als Initial-Aktivierungsschritt für die HotStarTaq DNA Polymerase, 40 Zyklen mit 15 s bei 95°C, 15 s bei entsprechender Annealingtemperatur und 30 s bei 72°C. Bei der Transkriptionsanalyse des *tri5/bt2*-Gens wurde dem beschriebenen Protokoll eine Schmelzkurvenanalyse

(75°C-95°C, 1,4°C/s) angefügt. Dadurch war es möglich die eingesetzte cDNA auf DNA Verunreinigungen zu untersuchen. Die spezifischen Schmelzpunkte der cDNA- und DNA-Fragmente von *bt2* unterschieden sich um etwa 2°C.

Für den Master Mix wurde der QuantiTect SYBR Green PCR Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Dazu wurden die Primer aus Tab. 6 (Endkonzentration 0,3 µM je Primer) gegeben. Jedem 22 µl Ansatz wurden 2 µl Template hinzugefügt.

Tab. 7: Annealingtemperatur für Realtime-PCR

Fusarium-Art	Annealingtemperatur	Gen	Annealingtemperatur
<i>F. graminearum</i>	67°C	<i>tri5</i> -Gen	57°C
		<i>bt2</i> -Gen	57,5°C

F. graminearum

Für den Nachweis von *F. graminearum* wurde neben den Primern zusätzlich eine Hybridisierungssonde (Tab. 6) eingesetzt (Endkonzentration 0,2 µM). Für den Master Mix wurde der QuantiTect Probe PCR Kit von Qiagen (Hilden) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die Endkonzentration eines jeden Primers betrug 0,3 µM. Jedem 22 µl Ansatz wurden 2 µl Template hinzugefügt.

Das Temperaturprofil bestand aus folgenden Schritten: 15 min bei 95°C als einmaliger Initial-Aktivierungsschritt für die HotStarTaq DNA Polymerase, anschließend 40 Zyklen mit 15 s bei 95°C und 1 min bei 67°C (siehe Tab. 7).

2.3.4.5 RT-PCR

Die RT-PCR für die Expressionsanalysen des *tri5*-Gens erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde die RNA nach der DNase-Behandlung mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend die so gewonnene cDNA in einer quantitativen PCR eingesetzt (siehe 2.3.4.1 und 2.3.4.4).

In der RT-Reaktion wurde der Omniscript RT-Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Für einen Reaktionsansatz von 20 µl wurden 2 µl Buffer-RT (10 x), 2 µl dNTP-Mix (5 mM jeweils), 2 µl Random Hexamer-Primer (10 µM, Promega/Mannheim), 1 µl RNasin Plus RNase Inhibitor (10 U/µl, Promega, Mannheim), 1 µl RT (4 U/µl) und 2 µl steriles H₂O zu 10 µl DNase-behandelte RNA-Probe gegeben. Die RT-Reaktion erfolgte bei 37°C für 90 min.

2.3.4.6 Relative Quantifizierung

Die Expression des *tri5*-Gens wurde über die Relative Quantifizierung bei der Realtime RT-PCR (siehe 2.3.4.4 und 2.3.4.5) ermittelt (Pfaffl, 2001). Als Referenzgen wurde *bt2* gewählt, dessen Expression allgemein als relativ gleichmäßig eingeschätzt wird (Mayer et al., 2003; Doohan et al., 1999; Voigt et al., 2007).

Bestimmung der Effizienz

Grundlegende Bedeutung bei der Relativen Quantifizierung besitzt die Effizienz der verwendeten PCR-Systeme für das Ziel-Gen *tri5* und das Referenz-Gen *bt2*. Die Bestimmung der Effizienzen (E) erfolgte in der Realtime PCR mit der oben (2.3.4.4) beschriebenen DNA-Standardreihe. Dabei werden die einzelnen Verdünnungsstufen gegen die C_T -Werte der einzelnen Verdünnungsstufen aufgetragen und die Steigung der sich ergebenden Gerade ermittelt. Die Effizienz berechnet sich nach der Formel: $E = 10^{-1/\text{Steigung der Standardgeraden}}$ (Roche, 2003). Eine Effizienz von 2 bedeutet daher eine Verdoppelung der DNA. Bei einem Unterschied von $\leq 0,05$ zwischen den Effizienzen, kann von einer gleichen Effizienz ausgegangen werden. Zwischen der Effizienz der *tri5*-PCR ($\sim 1,94$) und der Effizienz der *bt2*-PCR ($\sim 1,76$) konnte ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde bei jeder PCR für beide Primersysteme die entsprechende Standardreihe mitgeführt und daraus die jeweilige Effizienz berechnet. Um die Schwankungen zwischen den einzelnen PCR-Läufen korrigieren zu können, diente der unverdünnte DNA-Standard als Kalibrator. Dabei werden die Unterschiede zwischen den Kalibrator- C_T -Werten bestimmt und die C_T -Werte der Proben bei den einzelnen PCR-Läufen um die dadurch ermittelte Differenz korrigiert. Die Formel für die Berechnung des korrigierten Verhältnisses (=Ratio) der Expression des Ziel-Gens zu Expression des Referenz-Gens (Pfaffl, 2001) war wie folgt:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{referenz}})^{\Delta CP_{\text{referenz}}(\text{control-sample})}}$$

(Ratio = Verhältnis, target = Ziel-Gen, CP = C_T = threshold cycle, control = Kalibrator, sample = Probe)

Bei einigen am Anfang durchgeführten PCR-Läufen wurde keine Standardreihe mitaufgetragen, sondern lediglich der Kalibrator. Bei diesen Läufen wurde für jedes Primersystem mit einer durchschnittlichen Effizienz gerechnet, die sich aus eigens zur Bestimmung der Effizienz eingesetzten Verdünnungsreihen ergab. Die derartig berechneten durchschnittli-

chen Effizienzen unterschieden sich nicht wesentlich von Effizienzen, die sich aus den bei den einzelnen PCR-Läufen mitgeführten Standardreihen errechnete.

2.3.5 DON-ELISA

Zur Bestimmung des DON-Gehalts, die an den Ährenproben parallel zur Expression des *tri5*-Gens erfolgte, wurde der DON-ELISA-Kit von Transia (Art. 51010, Ober-Mörlen) unter Einbeziehung der mitgelieferten DON-Standards verwendet. Es handelte sich um einen indirekten kompetitiven Test. Die Nachweisgrenze des Assays betrug $<50 \mu\text{g/kg}$ für Getreide. Die Durchführung wurde hinsichtlich der Probenvorbereitung, wie folgt, abgeändert und anschließend nach Empfehlungen des Herstellers weitergeführt:

1. 9 ml destilliertes H_2O wurden zu $473,7 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ getrockneter, gemahlener Pflanzenprobe in einem Zentrifugenröhrchen gegeben und kurz auf dem Vortex geschüttelt.
2. Die fixierten Röhrchen wurden liegend 20 min bei 300 Hz geschüttelt.
3. Anschließend wurde 10 min bei $2000 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert.

Ab diesem Schritt wurde nach den Angaben im Herstellerprotokoll fortgefahren.

Die Extinktionen wurden mit dem ELISA-Photometer „Lambda K“ von MWG-Biotech (Ebersberg) bei 450 nm gemessen.

2.4 Statistische Auswertung

2.4.1 Allgemeines zur Berechnung der Probenmittelwerte

Die DNA- und RNA-Ergebnisse setzen sich wie folgt zusammen: an jedem Probenstag, wurden an beiden Standorten von jeder Sorte 10 Mischproben (=10 Wiederholungen) aus Blättern bzw. Ähren gezogen. Diese 10 Wiederholungen wurden im folgenden als Charge bezeichnet. Von wenigen Chargen wurden alle 10 Wiederholungen ausgewertet. Von den meisten Chargen wurden aus zeitlichen und finanziellen Gründen nur 5 Wiederholungen untersucht. Die restlichen 5 Wiederholungen einer Charge wurden für eventuelle unsichere Ergebnisse aus den ersten 5 Wiederholungen als Kontrolle zurückgestellt. Jede Wiederholung wurde in der Expressionsanalyse zweimal und in den sonstigen DNA-Analysen dreimal aufgetragen. Dadurch ergaben sich beispielsweise bei DNA-Untersuchungen von Trichothecebildnern 15 Messwerte pro Charge. Die drei Messwerte einer Wiederholung wurden bei allen DNA-Analysen logarithmiert und anschließend daraus der Mittelwert für eine Probe errechnet. Aus diesen 5 bzw. 10 Probenmittelwerten errechnete sich dann der Chargen-Mittelwert für einen Probenahmetermin, eine Sorte und einen Standort. Bei der

Expressionsanalyse wurde direkt aus den beiden Ratios einer Probe ein Mittelwert gebildet und diese 5- 10 Probenmittelwerte zu einem Chargenwert verrechnet.

Für den DON-ELISA wurden die Extrakte von 5 Wiederholungen jeweils 2-mal aufgetragen. Aus diesen 2 Werten je Wiederholung wurden Mittelwerte gebildet, welche wiederum mit den 5 Wiederholungen gemittelt wurden. Somit setzte sich ein Chargen-Mittelwert aus 10 Messwerten zusammen. Die Messwerte der ELISA-Untersuchungen wurden nicht logarithmiert.

2.4.2 Statistische Berechnung

Die Berechnung von Mittelwert, einfacher Standardabweichung und die Logarithmierung der Daten erfolgte im Tabellenkalkulationsprogramm Excel von Microsoft.

Für die Berechnung der Trendlinie diente ein polynomisches Modell ($y = b + c_1x + c_2x^2$) welches sowohl in Excel berechnet, als auch mit dem Statistik Programm SAS 9.1 (siehe nächster Abschnitt) bestätigt wurden.

Die weitere statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Statistik-Programm SAS 9.1 durchgeführt. So erfolgte vorab der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung:

```
proc univariate data=dname normal;
```

Die Berechnungen der Korrelation (Besteht zwischen den zeitlichen Verläufen von zwei Sorte/Standort/Jahr-Kombinationen oder zwei verschiedenen Nachweismethoden ein Zusammenhang wurde mit folgender Prozedur berechnet:

```
proc glm;  
model "Kombination1" = "Kombination2";
```

Der Tukey-Kramer-Test, ein multipler t-Test (Precht und Kraft, 1993), wurde für den Mittelwertsvergleich (Inwieweit haben Standort, Sorte oder Jahr einen Einfluss auf die Befallsentwicklung?) bei unbalancierten Daten eingesetzt. Hier ist ein Beispiel für *F. graminearum* auf den Standort bezogen dargestellt:

```
proc glm;  
class Standort Sorte Jahr;  
model Fgra = Standort Sorte Jahr Standort*Sorte Standort*Jahr Sorte*Jahr;  
means Jahr Sorte / tukey lines;  
by Standort;
```

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Nukleinsäuren-Extraktion

Die Extraktion von DNA und RNA aus Blättern, die mit einem kommerziell erhältlichen Kit durchgeführt wurden, bedurfte aufgrund ihrer Reinheit, ihrer ausreichenden Konzentration und guten PCR-Eignung nur einer geringen Optimierung. Ein höherer Aufwand war bei der Optimierung der DNA-Extraktion aus Ähren notwendig.

Dazu wurde die DNA-Extraktionsmethode nach Doyle und Doyle (1990) nach der DNA-Fällung auf Silika-Membran-Säulchen fortgesetzt und somit modifiziert. Für die Validierung des neuen DNA-Extraktionsverfahrens aus Ähren wurde Material von vier verschiedenen Entwicklungsstufen (BBCH 73, 80, 84 und 95) verwendet. Mit dem neu entwickelten Verfahren wurde zwischen 59,2 % und 26,8 % weniger DNA isoliert (Abb. 6) als bei der Methode nach Doyle und Doyle (1990). Trotz geringerer absoluter Menge an DNA, ergaben sich in der Realtime-PCR annähernd die selben C_t -Werte, wie am Beispiel von der DNA der Trichothecenbildner in Abb. 7 dargestellt ist. Dies spricht für eine höhere Reinheit der DNA-Extrakte bei der neuen Variante. Die Standardabweichungen der DNA-Konzentrationen bewegten sich bei der Methode nach Doyle und Doyle (1990) zwischen 0,1737 und 0,352. Die Standardabweichungen bei der neuen Methode lagen zwischen 0,0354 und 0,1546 und wiesen somit eine deutlich bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf.

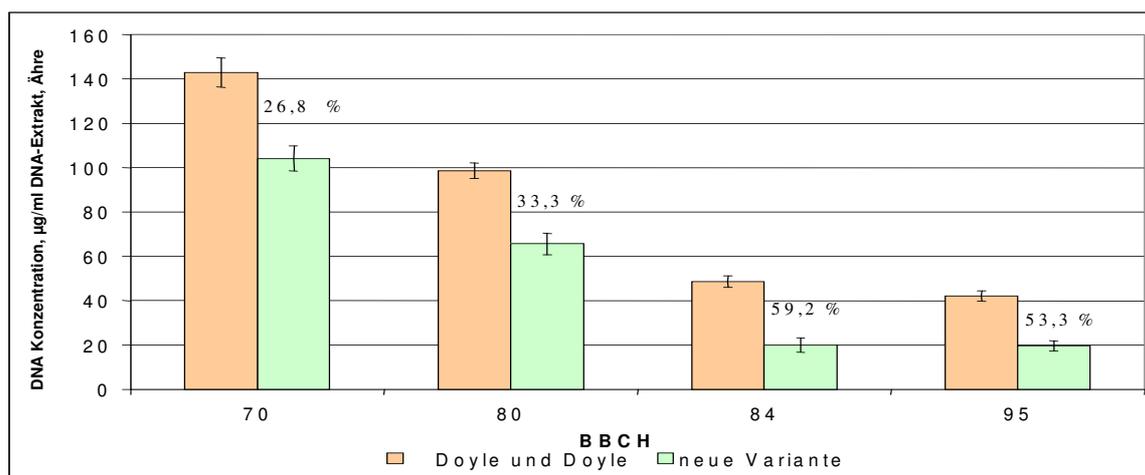


Abb. 6: DNA-Gehalte von Ährenproben verschiedener Entwicklungsstadien, die nach Doyle und Doyle (1990) bzw. nach dem neuen Verfahren extrahiert wurden.

Dargestellt sind die Mittelwerte, die einfache Standardabweichung und der prozentuale Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden.

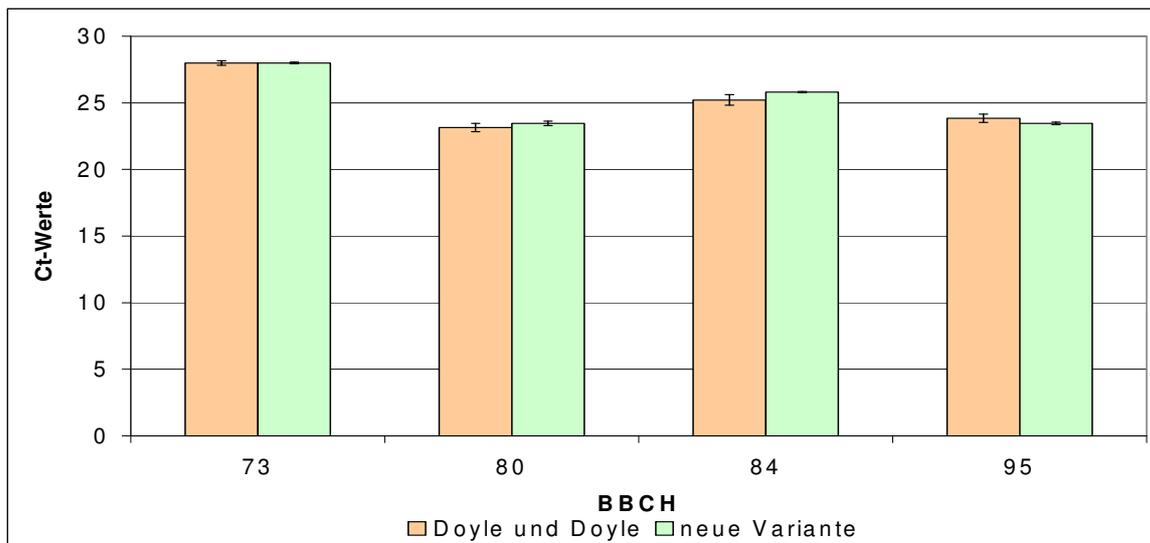


Abb. 7: Ct-Werte in der Realtime-PCR auf das *tri5*-Gen bei Verwendung verschiedener DNA-Extraktionsverfahren.

Dargestellt sind die Mittelwerte und die einfache Standardabweichung der Ct-Werte.

Die Amplifizierung in der PCR verlief mit der neuen Methode gleichmäßiger und konstanter (Abb. 8 und Abb. 9). Am deutlichsten wurde dieser Unterschied in den späteren Entwicklungsstufen, beispielweise kurz vor der Ernte (BBCH 95).

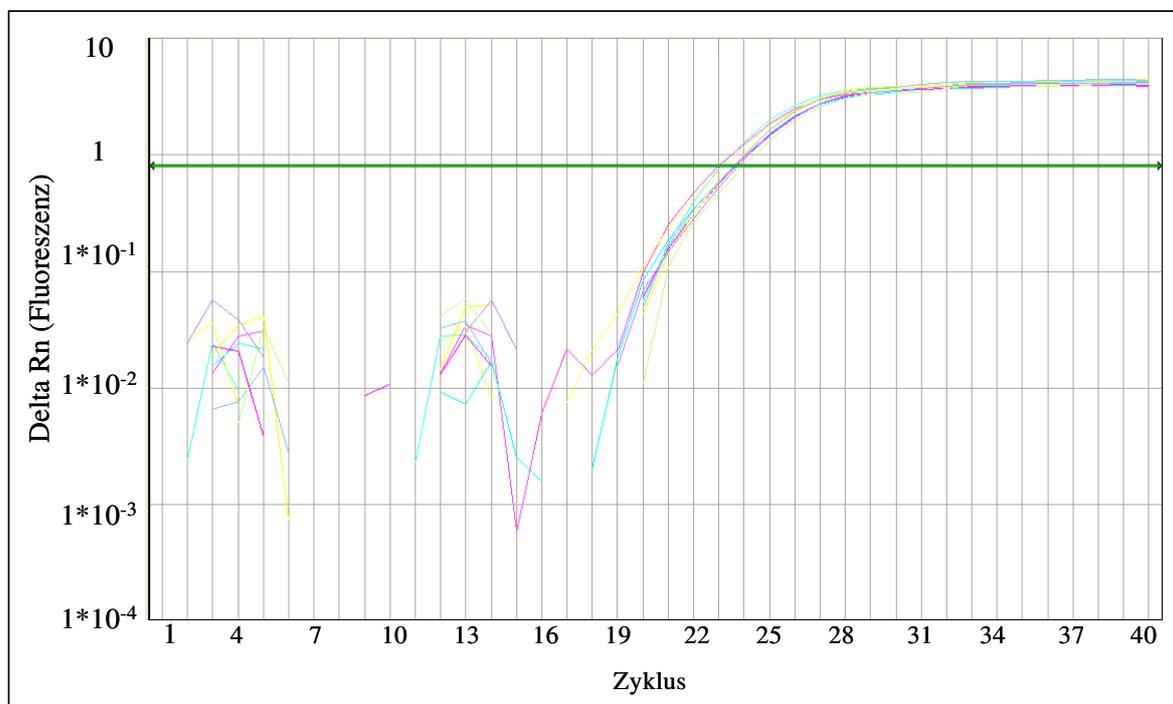


Abb. 8: Realtime-PCR-Amplifizierung mit einer DNA-Probe aus BBCH 95 mit der neuen Variante extrahiert.

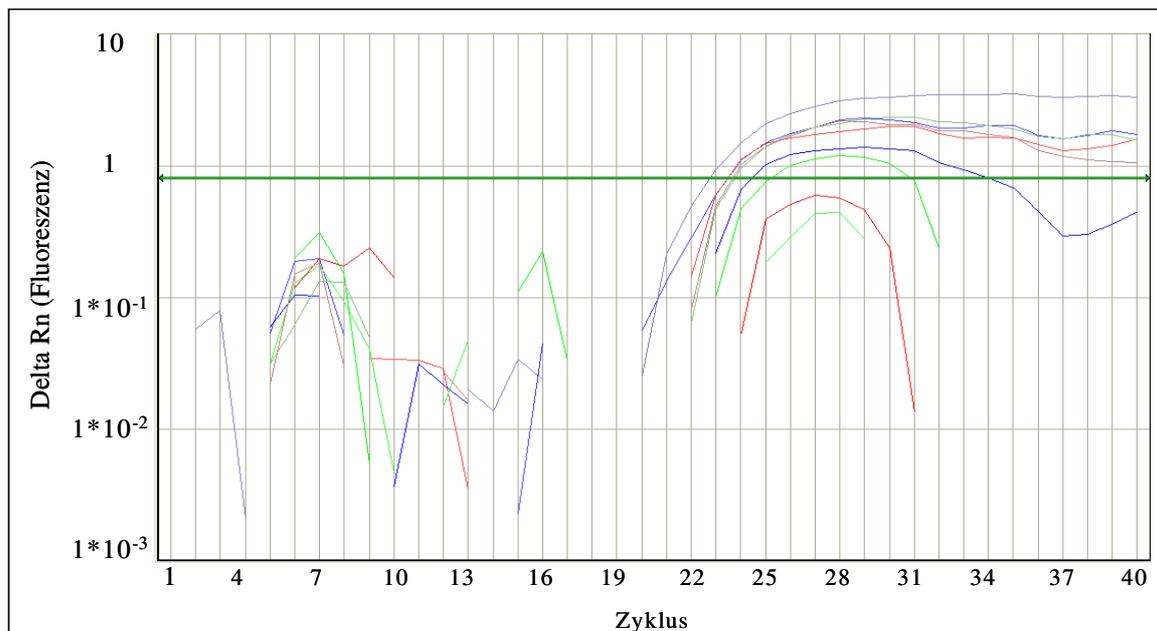


Abb. 9: Realtime-PCR-Amplifizierung mit einer DNA-Probe aus BBCH 95 mit der Original-Methode extrahiert

Aus den dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass die DNA-Extrakte, die mit der neuen Methode gewonnen wurden, für die Realtime-PCR besser geeignet sind.

3.2 Primer-Testung

Insgesamt wurden 32 verschiedene Primerkombinationen (Tab. 8) auf ihre Spezifität und Sensitivität hin in der PCR untersucht.

Tab. 8: Die verschiedenen Primersysteme und Anzahl der getesteten Primer.

Primer-Systeme	Anzahl der getesteten Primer
Pilz-Arten/Gene	
<i>F. graminearum</i>	12
<i>tri5</i> -Gen (<i>Fusarium</i>)	16
<i>bt2</i> -Gen (<i>Fusarium</i>)	2
GAPDH-Gen (Weizen)	2

Die Primerpaare wurden zunächst in einer Temperatur-Gradienten-PCR (56,4°C - 63°C) und mit drei verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen (1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM) untersucht. Für jedes Zielgen wurde das am besten geeignete Primerpaar (Tab. 10) sowie die optimale Kombination der MgCl₂-Konzentration und Annealing-Temperatur bestimmt. Diese Parameter wurden bei den weiteren Untersuchungen verwendet wie in 2.3.4 beschrieben.

Mit den ermittelten optimalen Bedingungen wurde das Primerpaar in einer weiteren PCR dann auf Spezifität gegenüber anderen *Fusarium*- Arten und *M. nivale* (Tab. 9) hin getestet.

Tab. 9: Übersicht über die Tests auf Spezifität der Primersysteme für *F. graminearum* und das *tri5*-Gen bei denen keine Kreuzreaktionen mit anderen *Fusarium*-Arten und *Microdochium*-Arten auftraten

`+'= getestet, `-'= nicht getestet

Primer-System für	getestet auf	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. pseudograminearum</i>	<i>M. nivale</i> var. <i>nivale</i>	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>
<i>F. graminearum</i>		+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tri5</i> -Gen		+	+	+	+	+	+	-	-

Dabei wurden die Standardlösungen (siehe 2.3.1.1) verschiedener Gattungen und Arten (Tab. 9) mit der Positivkontrolle (Standardlösung 2.3.1.1) der zu testenden *Fusarium*-Art in die entwickelte PCR eingesetzt. Primer, die sich in der konventionellen PCR als spezifisch erwiesen hatten, wurden für die darauffolgenden Realtime-PCR-Untersuchungen verwendet.

Auch in der Realtime-PCR, die im Vergleich zur konventionellen PCR sensitiver ist, ergaben sich weder bei den SYBR Green I basierenden Systemen noch beim Einsatz der Gensonde zum Nachweis von *F. graminearum* Kreuzreaktionen, so dass diese Primer für die Realtime-Untersuchungen der Proben aus den Feldversuchen verwendet werden konnten (Tab.10).

Tab. 10: Die verwendeten Primer bzw. Gensonde, ihre Sequenzen, Länge der amplifizierten DNA-Fragmente und das korrespondierende Gen.

Primer-name	Organismus/ Gen	Sequenz	Fragmentlänge	entsprechendes Gen
FGtubf FGtubr FGtubTM-Sonde	<i>F. graminearum</i>	5'-GGTCTCGACAGCAATGGTGT-3' 5'-GCTTGTGTTTTTCGTGGCAGT-3' FAM-5'- ACAACGGAACGG- CACCTCTGAGCTCCAGC3'-TAMRA	111 bp	<i>beta tubulin</i>
tri5S-F tri5S-R	<i>tri5</i> -Gen	5'-GAGCAGTACAACCTTGGAGG-3' 5'-ACCATCCAGTTCTCCATCTG-3'	120 bp	<i>tri5</i>
Bt2a Bt2b	<i>bt2</i>	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3' 5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTGGC-3'	340 bp	<i>beta-tubulin2</i>
GAPDH-F GAPDH-R	Weizen/GAPDH	5'-CCACCGGTGTCTTCACTGACAAGG-3' 5'-GCCTTAGCATCAAAGATGCTGG-3'	550 bp	GAPDH

3.3 DNA-Gehalte von Trichothecenproduzenten gemessen mit der Realtime-PCR

Um die Entwicklung der Trichothecen-Bildner in und auf der Pflanze verfolgen zu können, wurden mit der Realtime-PCR sowohl Blätter als auch Ähren auf Trichothecenproduzenten-DNA untersucht. Dabei wurden fünf bis zehn Wiederholungen einer Charge (2.4.1) jeweils dreimal untersucht. Aus den erhaltenen Meßwerten wurden die Mittelwerte berechnet. Im Folgenden sind ausschließlich die Chargen-Mittelwerte gezeigt. Die Chargen, bei denen diese DNA messbar war, wurden für die weiteren Untersuchungen, wie Expressionsanalysen des *tri5*-Gens, Tests auf *F. graminearum* und Bestimmungen des DON-Gehalts, verwendet.

Bei den Blättern konnten in 2004 keine reproduzierbaren DNA-Gehalte der Trichothecenproduzenten gemessen werden. Nur in sehr wenigen Fällen waren DNA-Gehalte messbar. Da in 2004 der *Fusarium*-Befall deutlich höher war als 2005 wurde im zweiten Jahr auf

Untersuchungen der Blätter verzichtet. Aus diesem Grund beschränkten sich die nachfolgenden Untersuchungen auf die Ährenproben.

Im Verlauf der Vegetationsperioden, von Beginn der Blüte bis zur Ernte (BBCH 64 - BBCH 100), in 2004 (Abb. 10 und Abb. 11) und 2005 (Abb. 12 und Abb. 13) stieg der Gehalt an DNA der Trichothecenbildner in den Ährenproben in beiden Sorten und beiden Standorten deutlich an. Der zeitliche Verlauf dieser DNA-Gehalte war mit einer polynomischen Funktion beschreibbar.

Das Bestimmtheitsmaß (R^2) lag 2004 (Abb. 10) zwischen 0,95-0,79. Dadurch konnte mit dieser quadratischen Funktion die Entwicklung der Zunahme an Trichothecenbildner-DNA in Weizen bestimmt werden. Zwischen den Standorten war kaum ein Unterschied zu erkennen. Die Sorte 'Complet' war stärker befallen als die Sorte 'Petrus'.

In 2005 war der Verlauf zwar mit einer polynomischen Funktion 2. Grades noch gut zu erklären. Der Befall mit *Fusarium* 2005 verlief jedoch auf einem niedrigeren Niveau als 2004, wie aus dem DNA-Gehalt und der Steigung der Trendlinie ersichtlich wird (siehe 3.8.2).

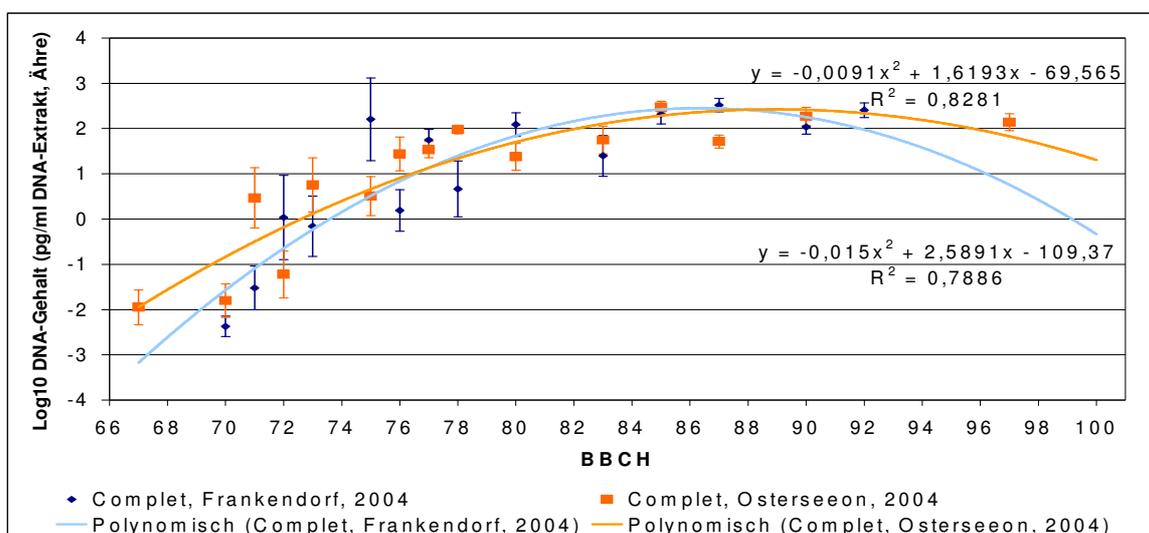


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf des Gehalts von Trichothecenproduzenten-DNA im Jahre 2004 in Frankendorf und Osterseeon bei 'Complet'.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der logarithmierten DNA-Gehalte aus 2004 und die Standardabweichungen zu BBCH 67-100. Zusätzlich sind die Trendlinien für beide Standorte mit dem entsprechenden R^2 und der dazugehörigen Regressionsgleichung dargestellt.

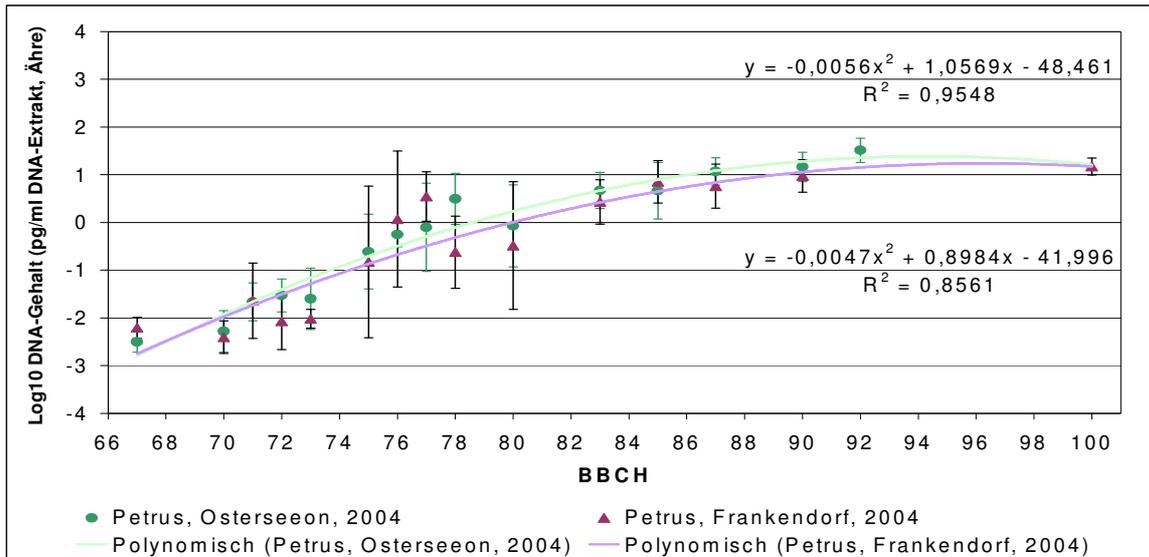


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf des Gehalts von Trichothecenproduzenten-DNA im Jahre 2004 in Frankendorf und Osterseeon bei `Petrus`.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der logarithmierten DNA-Gehalte aus 2004 und die Standardabweichungen zu BBCH 67-100. Zusätzlich sind die Trendlinien für beide Standorte mit dem entsprechenden R^2 und der dazugehörigen Regressionsgleichung dargestellt.

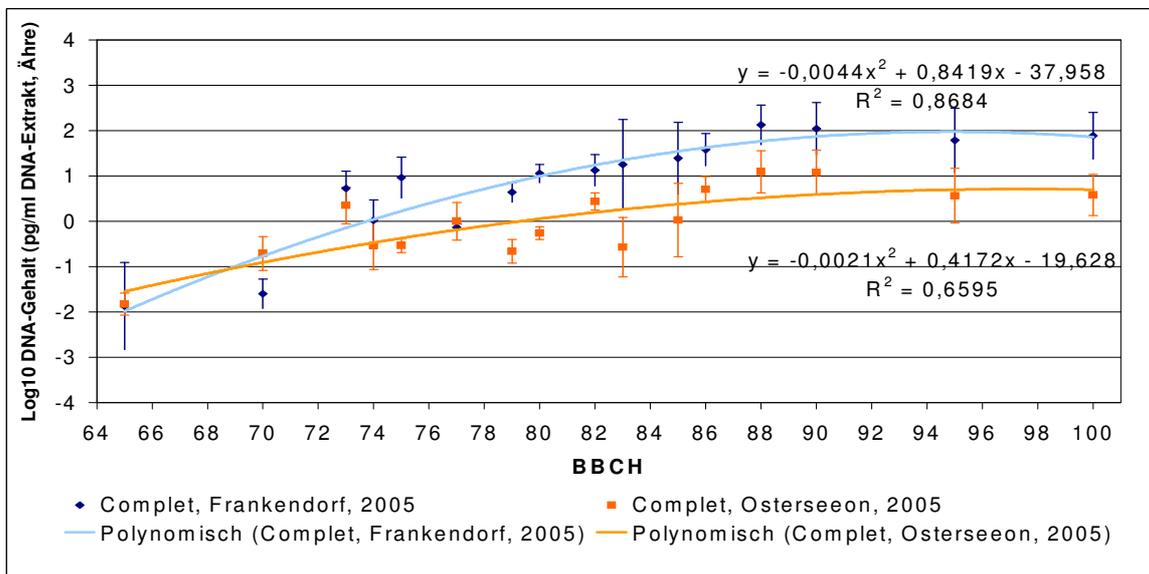


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf des Gehalts von DNA der Trichothecenbildner im Jahre 2005 in Frankendorf und Osterseeon bei `Complet`.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der logarithmierten DNA-Gehalte aus 2005 und die Standardabweichungen zu BBCH 65-100. Zusätzlich sind die Trendlinien für beide Standorte mit dem entsprechenden R^2 und der dazugehörigen Regressionsgleichung dargestellt.

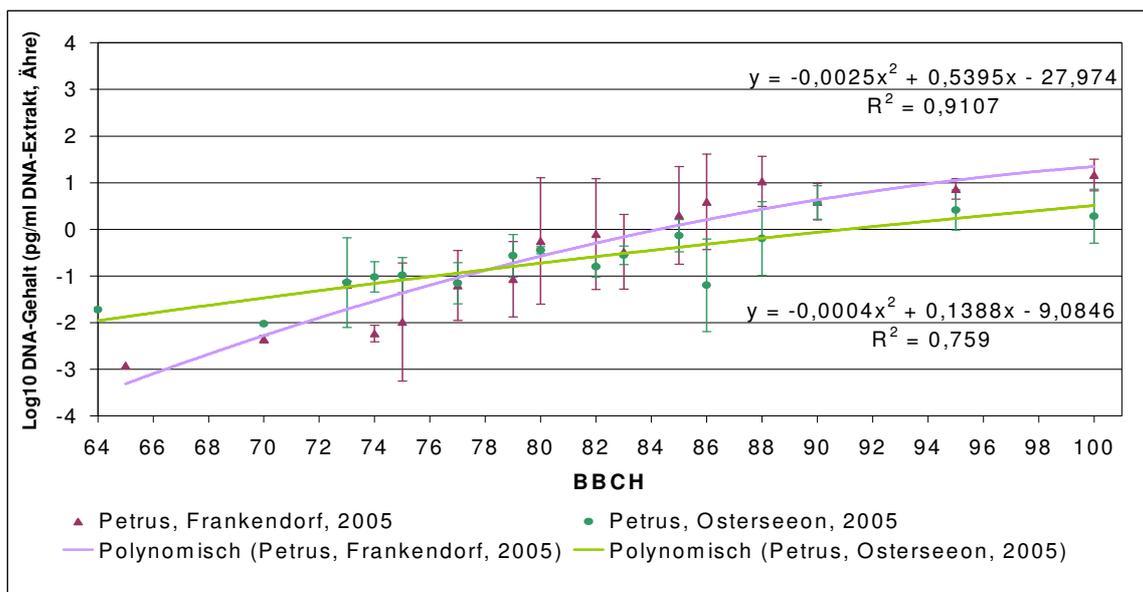


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf des Gehalts von Trichothecenproduzenten-DNA im Jahre 2005 in Frankendorf und Osterseeon bei 'Petrus'.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der logarithmierten DNA-Gehalte aus 2005 und die Standardabweichungen zu BBCH 65-100. Zusätzlich sind die Trendlinien für beide Standorte mit dem entsprechenden R^2 und der dazugehörigen Regressionsgleichung dargestellt.

3.4 Vergleich der zeitlichen Verläufe der Trichothecenproduzenten-DNA und der *F. graminearum*-DNA

Chargen, welche in der PCR für die Trichothecenbildner ein positives Ergebnis zeigten, wurden auf den Gehalt von *F. graminearum*-DNA untersucht. Im Unterschied zur Trichothecenproduzenten-DNA, welche mit SYBR Green I markiert wurde, erfolgte der Nachweis von *F. graminearum*-DNA mit einer Sonde. Die für die PCR auf Trichothecenproduzenten-DNA und *F. graminearum*-DNA verwendeten Extrakte waren identisch.

Exemplarisch sind in Abb. 14 bis Abb. 17 nur wenige zeitliche Verläufe der Gehalte an *F. graminearum*-DNA und Trichothecenbildner-DNA in Weizen dargestellt, da der Anstieg des DNA-Gehaltes bei allen Sorten, an beiden Standorten und in beiden Jahren einheitlich parallel verlief. Bei allen in Abb. 14 bis Abb. 17 gezeigten Verläufen war ein Anstieg des DNA-Gehaltes bis zur Vollreife und Beginn Totreife (BBCH 88-90) zu verzeichnen. Weitere Darstellungen sind im Anhang zu finden (5.4).

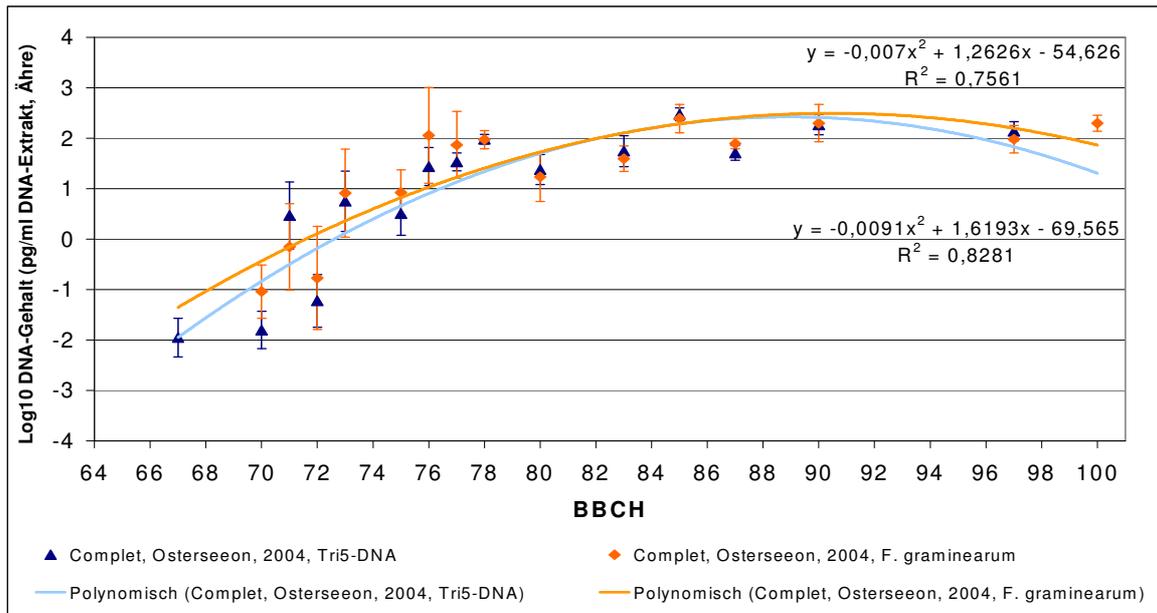


Abb. 14: Zeitliche Verläufe des Gehalts an Trichothecebildner-DNA und *F. graminearum*-DNA 2004 in Frankendorf bei 'Compleat'.

Ein Beispiel aus 2004 ist am Standort Frankendorf in der Sorte 'Compleat' abgebildet. Aufgetragen sind jeweils die logarithmierten DNA-Mittelwerte der DNA-Gehalte zur Entwicklungsstufe (BBCH), die Standardabweichungen und die jeweilige Trendlinie mit entsprechender Gleichung und Bestimmtheitsmaß (R^2).

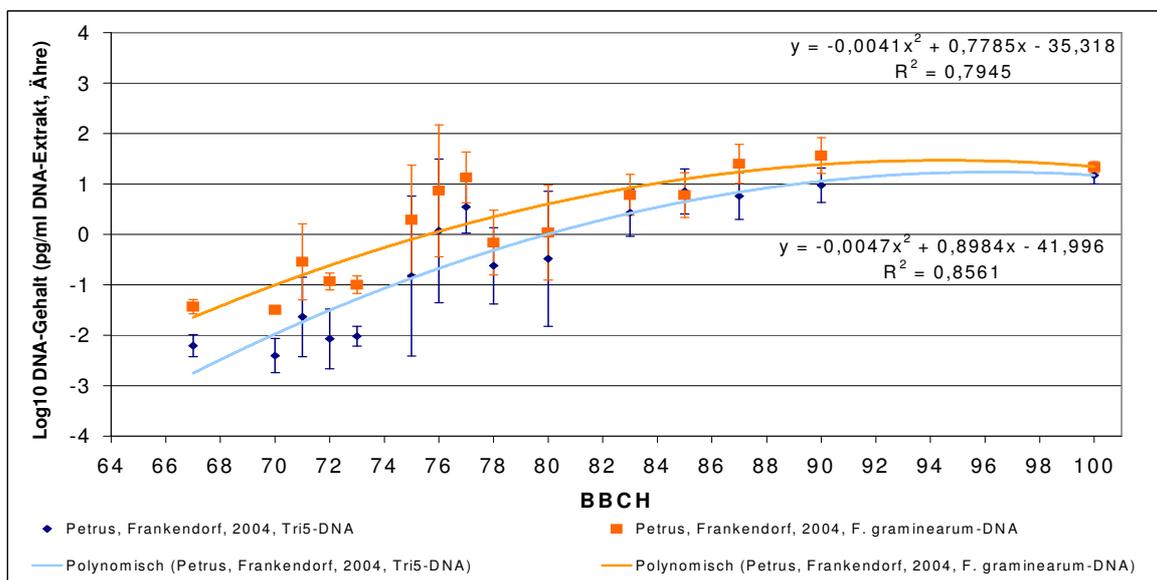


Abb. 15: Zeitliche Verläufe des Gehalts an Trichothecebildner-DNA und *F. graminearum*-DNA 2004 in Frankendorf bei 'Petrus'.

Ein Beispiel aus 2004 ist am Standort Frankendorf in der Sorte 'Petrus' abgebildet. Aufgetragen sind jeweils die logarithmierten DNA-Mittelwerte der DNA-Gehalte zur Entwicklungsstufe (BBCH), die Standardabweichungen und die jeweilige Trendlinie mit entsprechender Gleichung und Bestimmtheitsmaß (R^2).

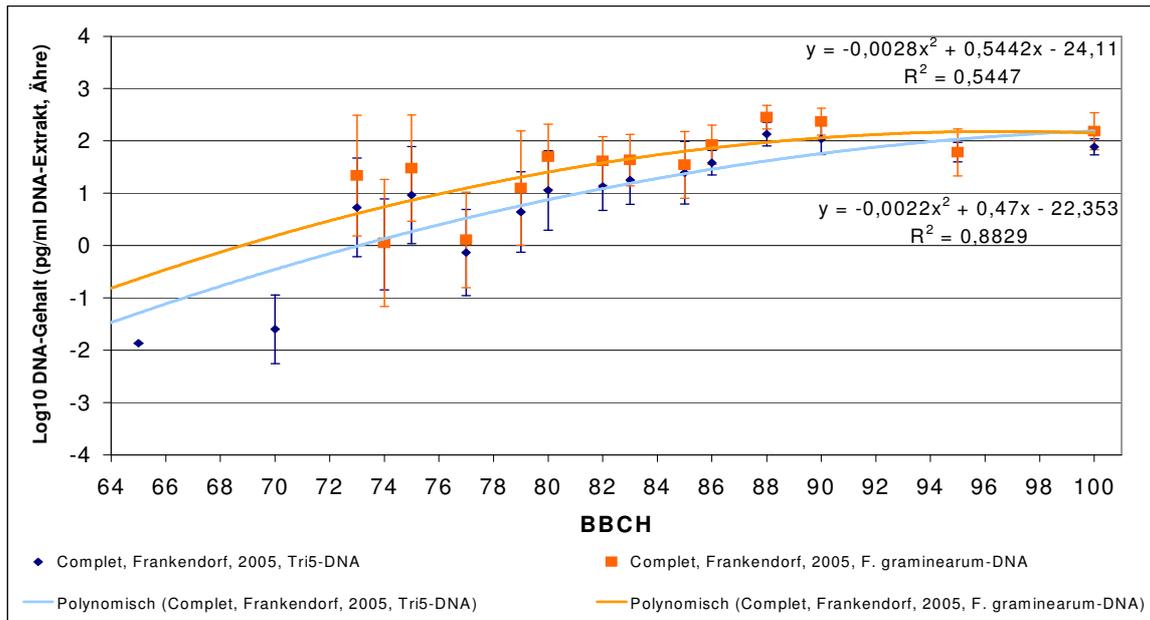


Abb. 16: Zeitliche Verläufe des Gehalts an Trichothecenproduzenten-DNA und *F. graminearum*-DNA 2005 in Frankendorf bei 'Complet'.

Ein Beispiel aus 2005 ist am Standort Frankendorf in der Sorte 'Complet' dargestellt. Aufgetragen sind jeweils die logarithmierten DNA-Mittelwerte der DNA-Gehalte zur Entwicklungsstufe (BBCH), die Standardabweichungen und die jeweilige Trendlinie mit entsprechender Gleichung und Bestimmtheitsmaß (R^2).

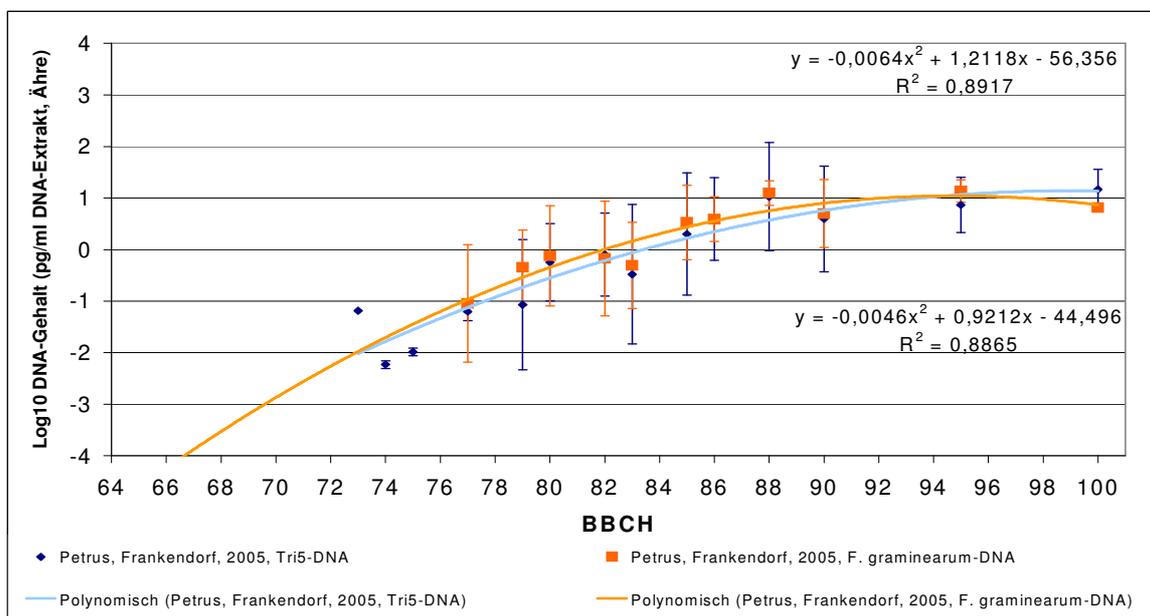


Abb. 17: Zeitliche Verläufe des Gehalts an Trichothecenproduzenten-DNA und *F. graminearum*-DNA 2005 in Frankendorf bei 'Petrus'.

Ein Beispiel aus 2005 ist am Standort Frankendorf in der Sorte 'Petrus' dargestellt. Aufgetragen sind jeweils die logarithmierten DNA-Mittelwerte der DNA-Gehalte zur Entwicklungsstufe (BBCH), die Standardabweichungen und die jeweilige Trendlinie mit entsprechender Gleichung und Bestimmtheitsmaß (R^2).

Auffallend war, dass sowohl die Detektion der DNA von Trichothecenproduzenten mit SYBR Green I als auch der *F. graminearum*-DNA mit einer spezifischen Sonde nicht nur eine nahezu identische zeitliche Entwicklungen des DNA-Gehaltes brachte, sondern auch ein annähernd identisches Niveau des DNA-Gehaltes zeigte.

3.5 Expression des *tri5*-Genes von *Fusarium* in Weizen

Ziel war es die Expression des *tri5*-Genes in Weizenähren von der Ährenblüte bis zur Ernte zu erfassen. Ein wichtiger Aspekt dabei war, ob sich ein Zusammenhang von Trichothecenproduzenten-DNA-Gehalt und Expression des Gens in Weizen erkennen lies.

Von den Ährenproben, welche bei der DNA-Analyse auf Trichothecenbildner einen positiven Gehalt an DNA aufwiesen, wurde, wie unter 2.3.2 beschrieben, die RNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Um mögliche Schwankungen bei der RNA-Verarbeitung zu erkennen und herausrechnen zu können, wurde als Referenzgen *bt2* eingesetzt. Die gemessenen C_t -Werte für *tri5*-cDNA wurden über eine interne *tri5*-DNA-Standardreihe in quantitative Werte umgerechnet. Das gleiche wurde für das Referenzgen *bt2* durchgeführt. Bei wenigen Realtime-PCR-Läufen zu Beginn wurde keine interne Standardreihe eingesetzt sondern lediglich ein Kalibrator (siehe 2.3.4.6) über welchen anschließend die Expression bestimmt wurde. Jeder gemessene *tri5*-cDNA-Gehalt wurde auf den korrespondierenden Gehalt an *bt*-cDNA bezogen und das relative Verhältnis (Ratio), als Maß für die Expression des *tri5*-Genes, daraus berechnet. Aus jeder Charge wurden 5 Wiederholungen jeweils doppelt für die Bestimmung des cDNA-Gehalts vom *tri5*-Gen und *bt2*-Gen in der Realtime-PCR verwendet.

Im Folgenden sind die zeitlichen Verläufe der Expression des Gens *tri5* in Weizenähren dargestellt (Abb. 18 bis Abb. 21). Um den Verlauf deutlicher zu machen wurden die einzelnen Expressionswerte der verschiedenen BBCHs miteinander verbunden, obwohl keine Aussage über den tatsächlichen Verlauf zwischen den Probennahmeterminen getroffen werden konnte, was auch auf die folgenden Grafiken zutrifft.

Wie in Abb. 18 zu erkennen ist, war 2004 in Frankendorf in beiden Sorten ein deutlicher Höchstwert der Expression des *tri5*-Genes in Weizen etwa zur Frühen Milchreife (BBCH 73- in 'Complet und BBCH 72- in 'Petrus') zu verzeichnen. Am Standort Osterseeon (Abb. 19) war die höchste Expression des *tri5*-Genes in 'Complet' zur Mittleren Milchreife (BBCH 75) und in 'Petrus' bereits in Ähren mit noch wässrigem Korninhalt (BBCH 71) zu messen.

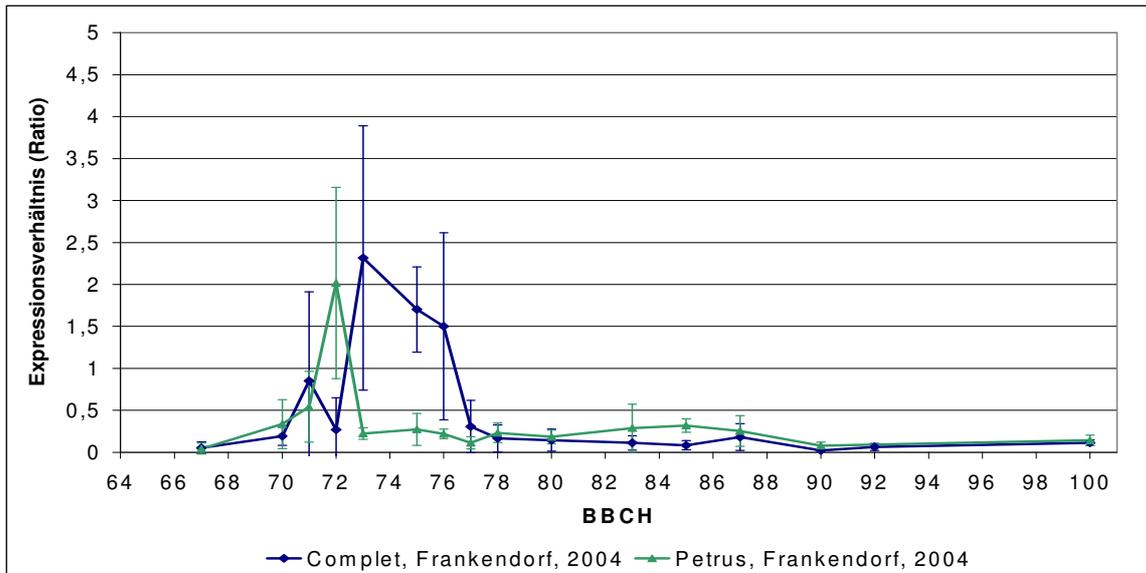


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Expression des *tri5*-Gens in Weizensorten 2004 in Frankendorf.

Dargestellt sind die Expressionsverhältnisse (Ratio) vom Gen *tri5* zum *bt2*-Gen im Laufe der Entwicklung von Weizen (BBCH) 2004 und die jeweilige Standardabweichung in den Sorten 'Complet' und 'Petrus' am Standort Frankendorf.

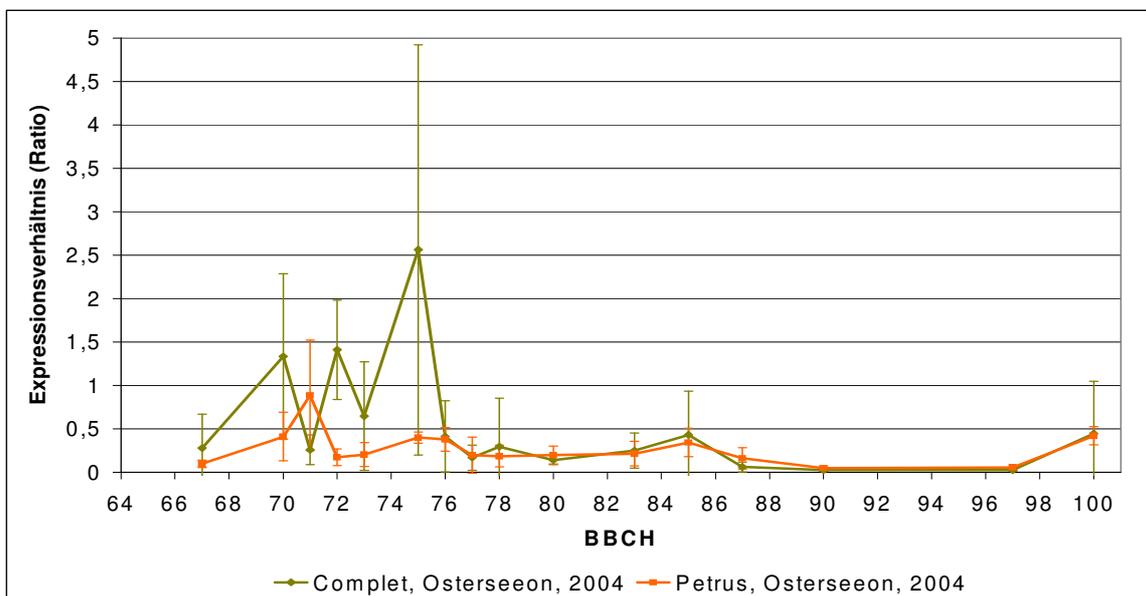


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der Expression des *tri5*-Gens in Weizensorten 2004 in Osterseeon.

Dargestellt sind die Expressionsverhältnisse (Ratio) vom Gen *tri5* zum *bt2*-Gen im Laufe der Entwicklung von Weizen (BBCH) 2004 und die jeweilige Standardabweichung in den Sorten 'Complet' und 'Petrus' am Standort Osterseeon.

Anschließend sank das Expressionsverhältnis bei allen Sorte/Standort-Kombinationen aus 2004 wieder auf ein niedriges Niveau, auf welchem es bis zur Ernte in etwa stabil blieb.

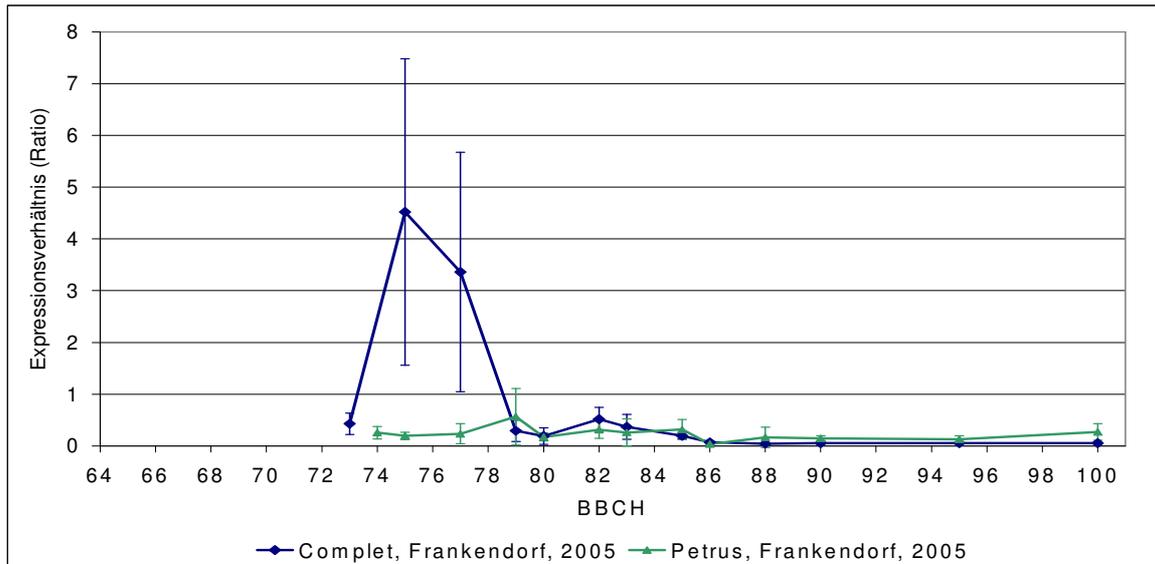


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der Expression des *tri5*-Gens in Weizensorten 2005 in Frankendorf.

Dargestellt sind die Expressionsverhältnisse (Ratio) vom Gen *tri5* zum *bt2*-Gen im Laufe der Entwicklung von Weizen (BBCH) 2005 und die jeweilige Standardabweichung in den Sorten 'Complet' und 'Petrus' am Standort Frankendorf.

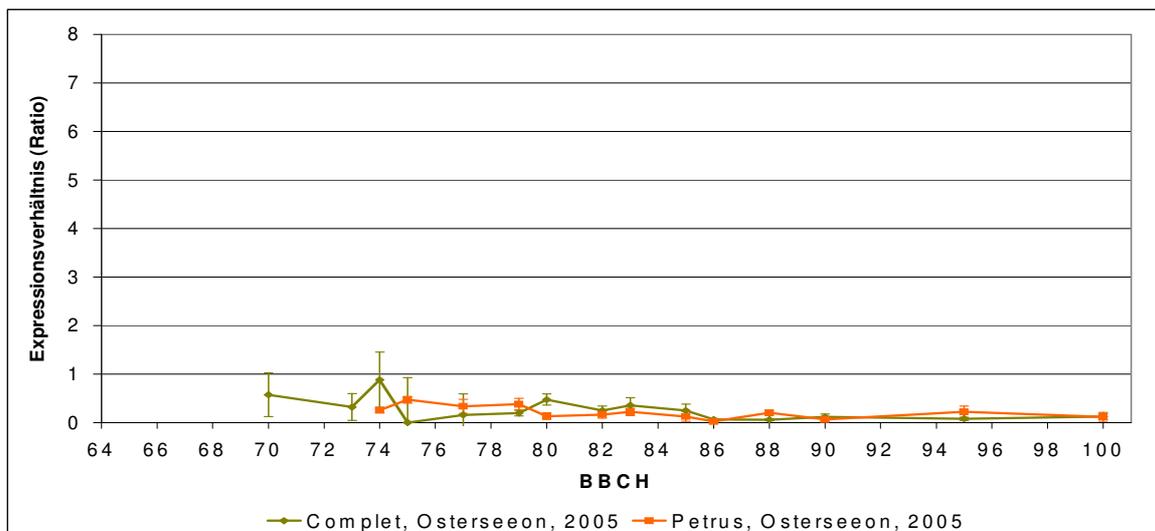


Abb. 21: Zeitlicher Verlauf der Expression des *tri5*-Gens in Weizensorten 2005 in Osterseeon.

Dargestellt sind die Expressionsverhältnisse (Ratio) vom Gen *tri5* zum *bt2*-Gen im Laufe der Entwicklung von Weizen (BBCH) 2005 und die jeweilige Standardabweichung in den Sorten 'Complet' und 'Petrus' am Standort Osterseeon.

Anders gestaltete sich die Expression des *tri5*-Gens 2005. In 'Complet' am Standort Frankendorf (Abb. 20) war zur Mittleren Milchreife (BBCH75) ein deutlicher Höchstwert der Expression zu erkennen. Wohingegen sich die Expressionen bei den weiteren Stand-

ort/Sorte-Kombinationen (Abb. 20 und Abb. 21) auf einem deutlich niedrigerem Niveau abspielten und auch keinen ausgeprägten Höchstwert aufwiesen. Diese Tendenz zeigte sich auch in den Ergebnissen der Trichotheceproduzenten-DNA (3.3). Auch dort war 2005 der Befall mit Trichothecebildnern am Standort Frankendorf in 'Complet' höher als in den weiteren Sorte/Standort-Kombinationen.

3.6 ELISA-Untersuchungen auf den DON-Gehalt

Um zusätzlich zu der gemessenen Expression des *tri5*-Gens und dem DNA-Gehalt der Trichotheceproduzenten in Weizen einen Eindruck über die Toxin-Belastung zu erhalten, wurden Untersuchungen auf das Mykotoxin DON mit einem ELISA-Test (2.3.5) durchgeführt. Ab einem DON-Wert von etwa 1,4 ppb lagen die Werte außerhalb des linearen Bereichs der Standardreihe, weshalb die Gehalte darüber möglicherweise noch größere Werte annehmen könnten. Der Test wurde mit Proben die von Ende der Blüte bis hin zur Ernte (BBCH 70-100) gezogen wurden durchgeführt.

Im Folgenden sind die zeitlichen Verläufe der gemessenen DON-Gehalte in den Ähren in den Jahren 2004 und 2005 dargestellt (Abb. 22 bis Abb. 25).

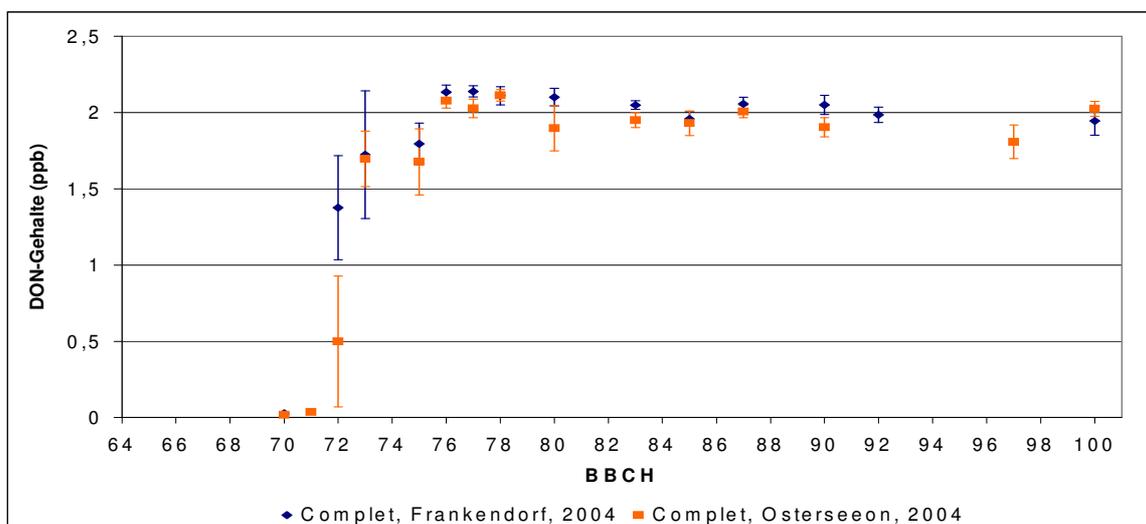


Abb. 22: Die zeitlichen Verläufe der DON-Gehalte 2004 in 'Complet' an beiden Standorten.

Dargestellt sind die DON-Gehalte in den Ähren 2004 mit der jeweiligen Standardabweichung zu den Entwicklungsstufen (BBCH) des Weizens in der Sorte 'Complet' an beiden Standorten.

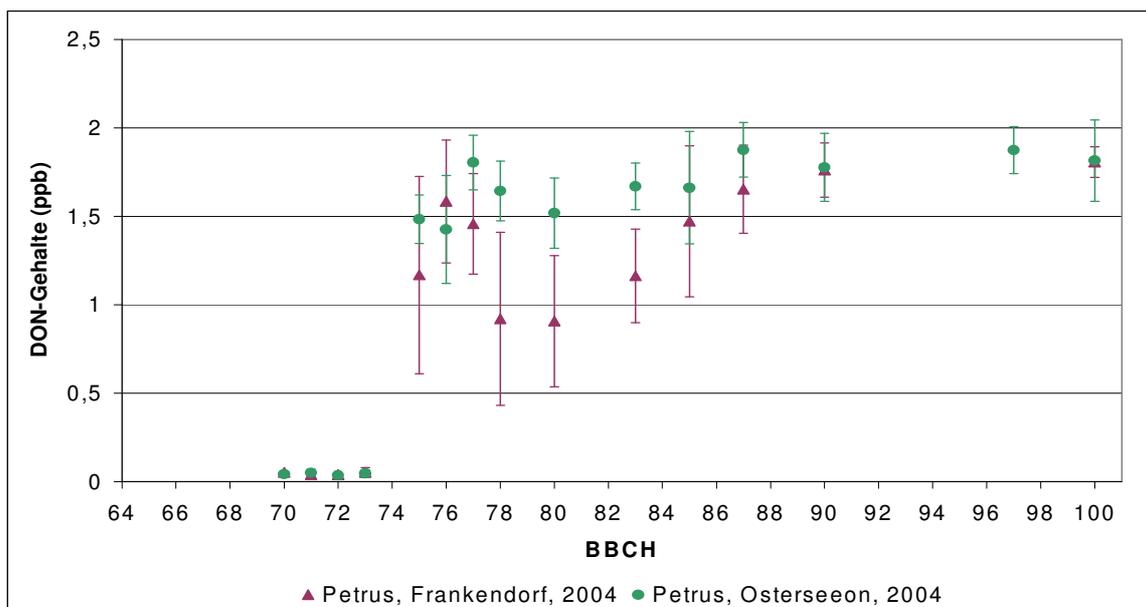


Abb. 23: Die zeitlichen Verläufe der DON-Gehalte 2004 in 'Petrus' an beiden Standorten.

Dargestellt sind die DON-Gehalte in den Ähren 2004 mit der jeweiligen Standardabweichung zu den Entwicklungsstufen (BBCH) des Weizens in der Sorte 'Petrus' an beiden Standorten.

Die zeitliche Verläufe des DON-Gehaltes in den Weizenähren entwickelten sich sowohl in 'Complet' (Abb. 22) als auch in 'Petrus' (Abb. 23) an beiden Standorten ähnlich. Der DON-Gehalt in der Sorte 'Complet' erreichte 2004 an beiden Standorten mit einem Maximalwert von 2,13 ppb und 2,11 ppb, ein höheres Niveau als die Sorte 'Petrus' mit maximal 1,81 ppb und 1,88 ppb. Die DON-Belastung in 'Petrus' wies an beiden Standorten nach einem deutlichen Anstieg ab der frühen Milchreife (BBCH 73) einen kurzfristigen leichten Abfall etwa zur späten Milchreife (BBCH 78) auf. Etwas anders verhielt sich die zeitliche Entwicklung des DON-Gehaltes in 'Complet', dort erfolgte etwa zu Ende Blüte/frühen Milchreife (BBCH 71) ein starker Anstieg. Ab der mittleren Milchreife (BBCH 76) erfolgte kein weiterer Anstieg, sondern eine Beibehaltung des erreichten DON-Niveaus. Diese im Vergleich zu in 'Petrus' gemessenen höheren DON-Gehalte in 'Complet' bestätigen die über PCR ermittelten höheren DNA-Gehalte von Trichothecenproduzenten und die stärkere *tri5*-Genexpression in 'Complet' gegenüber 'Petrus' (siehe auch 3.8).

Wie schon bei den Ergebnissen der Trichothecenproduzenten-DNA-Untersuchungen und der Expressionsanalysen des *tri5*-Gens aus 2005 ergaben sich auch in 'Complet' am Standort Frankendorf mit maximal 2,1 ppb die höchsten DON-Gehalte (Abb. 24). Ein frü-

her und sehr steiler Anstieg des DON-Gehaltes zeigte sich nur in 'Complet' in Frankendorf ab BBCH 73. Die DON-Gehalte in 'Complet' am Standort Osterseeon (Abb. 24) und in 'Petrus' an den Standorten Frankendorf und Osterseeon (Abb. 25) entwickelten sich mit Verzögerung und erreichten zudem nicht das hohe Niveau (maximal 1,4 ppb in 'Complet' in Osterseeon und in 'Petrus' in Frankendorf) (siehe auch 3.8.1).

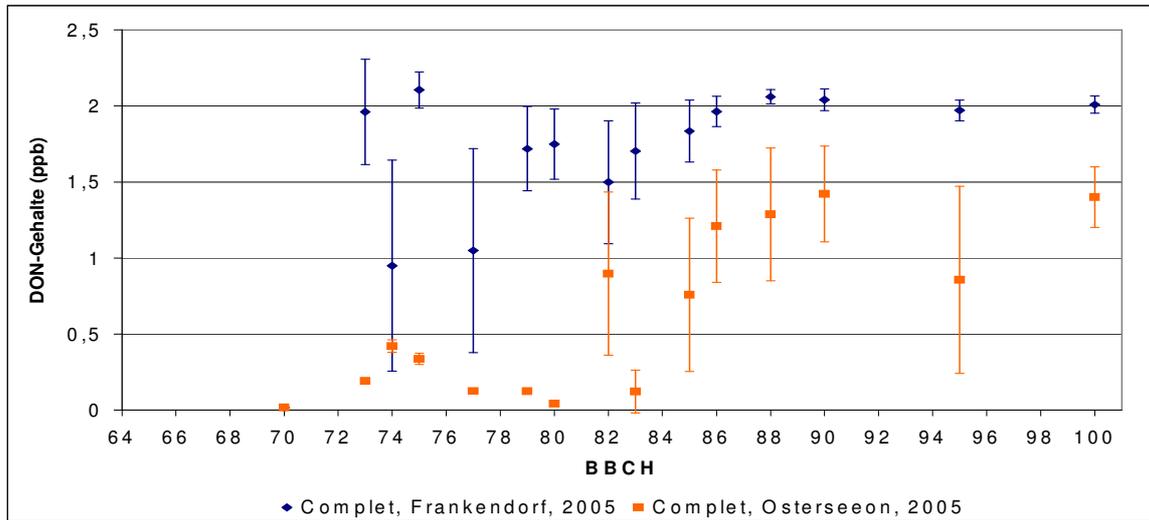


Abb. 24: Die zeitlichen Verläufe der DON-Gehalte 2005 in 'Complet' an beiden Standorten.

Dargestellt sind die DON-Gehalte in den Ähren 2005 mit der jeweiligen Standardabweichung zu den Entwicklungsstufen (BBCH) des Weizens in der Sorte 'Complet' an beiden Standorten.

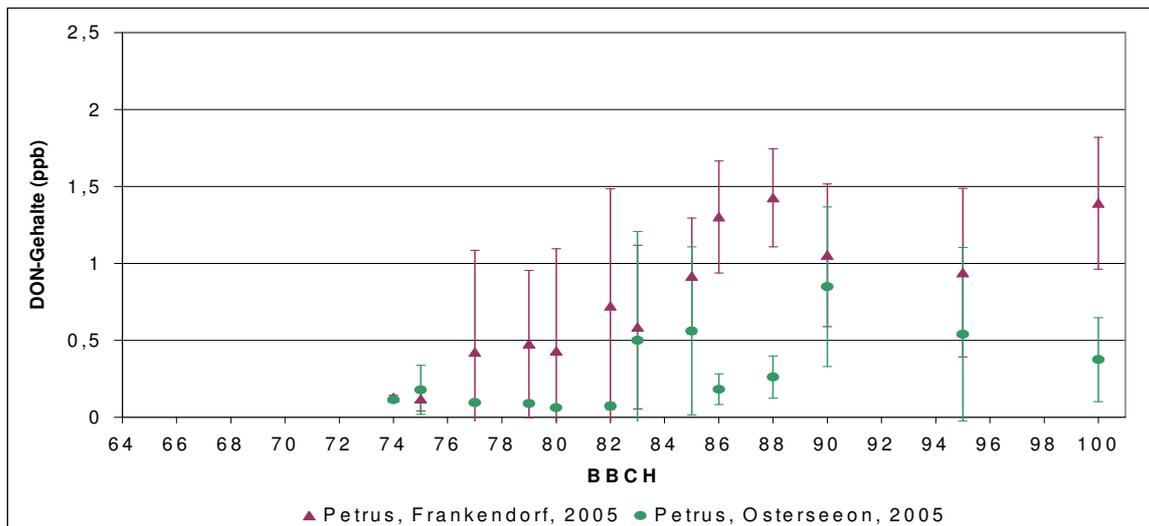


Abb. 25: Die zeitlichen Verläufe der DON-Gehalte 2005 in 'Petrus' an beiden Standorten.

Dargestellt sind die DON-Gehalte in den Ähren 2005 mit der jeweiligen Standardabweichung zu den Entwicklungsstufen (BBCH) des Weizens in der Sorte 'Petrus' an beiden Standorten.

3.7 Zusammenstellung der zeitlichen Verläufe vom DON-Gehalt, der *tri5*-Expression und des Gehalts an Trichothecenbildner-DNA in Weizen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem zeitlichen Verlauf der *Fusarium*-Infektion, gemessenen am DNA-Gehalt der Trichothecenproduzenten, der entsprechenden *tri5*-Genexpression und der DON-Produktion besser erkennen zu können, wurden die entsprechenden Werte für jeweils eine Sorte/Standort/Jahr-Kombination miteinander in eine Grafik aufgetragen. Da hier aus Platzgründen nicht alle Kombinationen gezeigt werden können, wird nur eine Auswahl in Abb. 26 und Abb. 27 dargestellt. Die weiteren Darstellungen sind im Anhang (5.5) einzusehen. Um die unterschiedlichen Verläufe besser erkennen zu können, sind die gemessenen Werte mit einer Linie verbunden.

Wie bereits in den Kapiteln zuvor beschrieben erfolgte im dargestellten Beispiel (Abb. 26) ab Ende der Blüte (BBCH 70) ein deutlicher Anstieg der DNA von Trichothecenproduzenten, der Höchstwert der *tri5*-Genexpression war in etwa zur frühen Milchreife (BBCH 73) erreicht und der Anstieg des DON-Gehaltes erfolgte auch in etwa ab Ende der Blüte (BBCH 70).

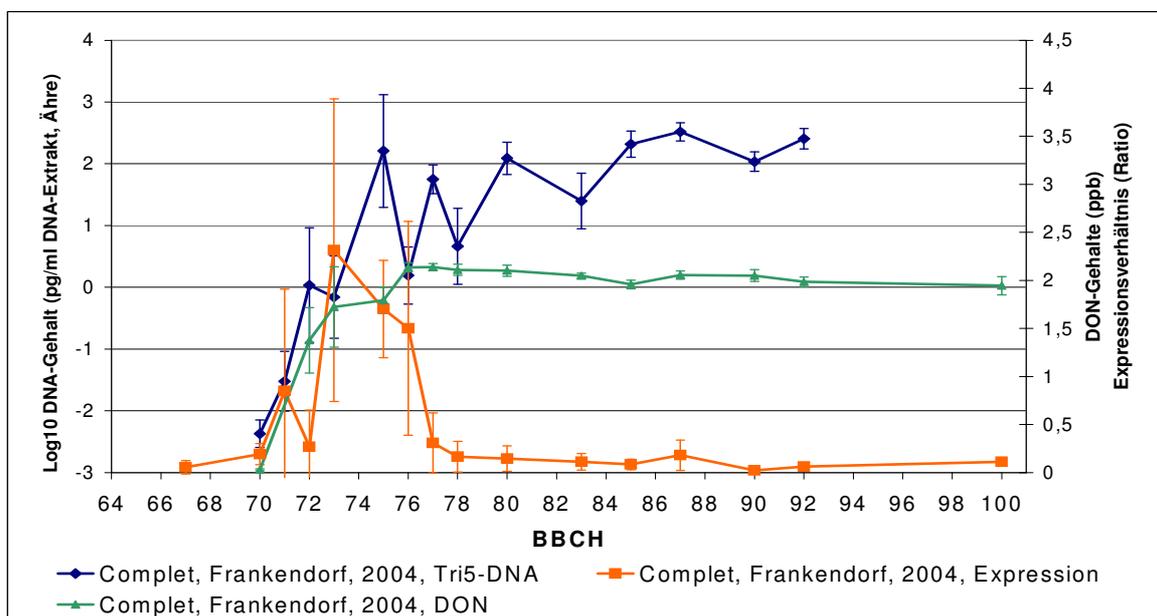


Abb. 26: Trichothecenbildner-DNA, Expression vom Gen *tri5* und DON-Gehalt in Weizen der Sorte 'Complet' am Standort Frankendorf 2004.

Dargestellt sind an der linken Y-Achse die logarithmierten DNA-Gehalte, an der rechten Y-Achse die DON-Gehalte und das berechnete Expressionsverhältnis vom Gen *tri5* zum Referenzgen *bt2*, zu den unterschiedlichen Entwicklungsstufen (BBCH). Zu allen Werten sind die Standardabweichungen angegeben.

Sehr ähnlich zu den eben gezeigten Verläufen waren die im nächsten Beispiel in Abb. 27. Hier begann der Anstieg der Trichothecenbildner-DNA ebenfalls zum Ende der Blüte (BBCH 70), der Höchstwert der *tri5*-Genexpression lag im Vergleich zu Abb. 26 etwas früher zum Ende der Blüte/Anfang Milchreife (BBCH 71), der Anstieg des DON-Gehaltes erfolgte zur frühen Milchreife (BBCH 73).

Generell fiel auf, dass die Daten für das Jahr 2004 (Abb. 31) ein deutlich einheitlicheres Bild lieferten als für das Jahr 2005 (Abb. 32). So waren die zeitlichen Verläufe in 2004 insgesamt gleichmäßiger und wiesen geringere Schwankungen auf. Bei den Expressionsuntersuchungen des *tri5*-Gens von *Fusarium* war bei der Sorte 'Petrus' ein deutlicher Höchstwert zwischen Ende der Weizenblüte und früher Milchreife (BBCH 70-73), bei 'Complet' zwischen Ende der Blüte und späte Milchreife (BBCH 70-77) zu erkennen. 2004 zeigte sich ein gleichmäßiger Trend zu ansteigenden DNA-Gehalten der Trichothecenproduzenten. Der Verlauf der DON-Gehalte in Weizen wies 2004 einen klaren Anstieg zwischen Ende der Blüte und später Milchreife (BBCH 70 -77) auf und verblieb danach weitgehend auf dem erreichten Toxin-Niveau. Im Anbaujahr 2005 waren in den

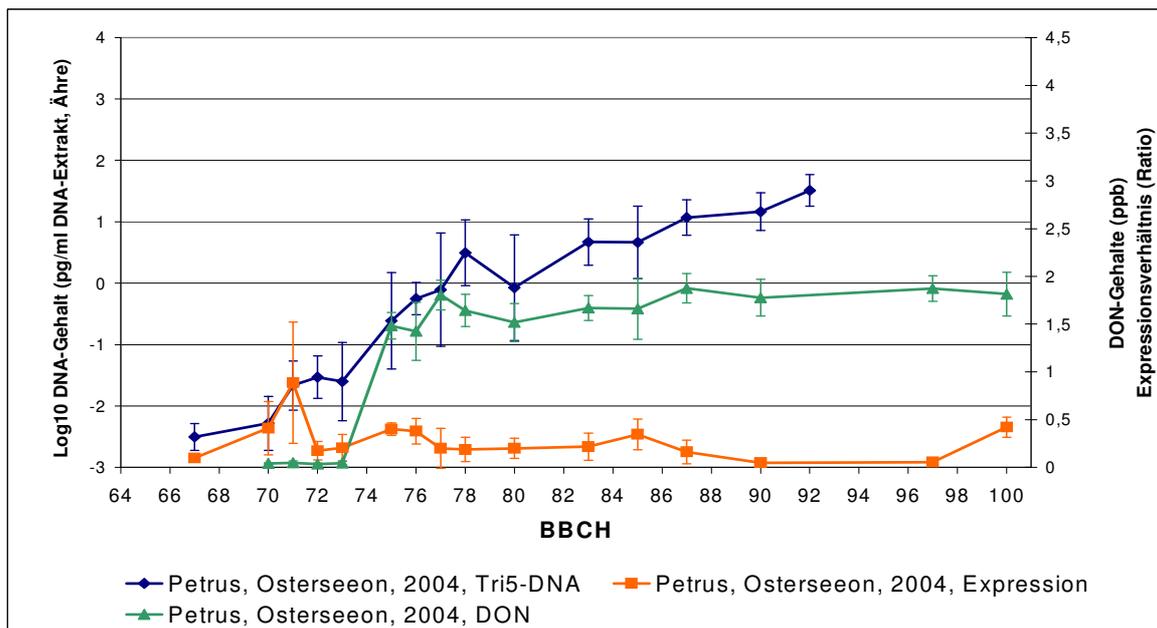


Abb. 27: Trichothecenproduzenten-DNA, Expression vom Gen *tri5* und DON-Gehalt in Weizen der Sorte 'Petrus' am Standort Osterseeon 2004.

Dargestellt sind an der linken Y-Achse die logarithmierten DNA-Gehalte, an der rechten Y-Achse die DON-Gehalte und das berechnete Expressionsverhältnis vom Gen *tri5* zum Referenzgen *bt2*, zu den unterschiedlichen Entwicklungsstufen (BBCH). Zu allen Werten sind die Standardabweichungen angegeben.

zeitlichen Verläufen weniger deutliche Trends zu verzeichnen. Dadurch war der zeitliche Zusammenhang zwischen DNA-Gehalt an Trichothecenbildnern, *tri5*-Expression und DON-Gehalt von *Fusarium* im Weizen schwerer zu erkennen. Der Verlauf des DNA-Gehalts an Trichothecenbildnern 2005 war dabei ebenfalls, wie in 2004, in der Tendenz deutlich steigend, wenn auch mit größeren Schwankungen. Bei der Expressionsanalyse des *tri5*-Genes in Weizen setzte sich die hohe Expression in 'Complet' am Standort Frankendorf zwischen früher und später Milchreife (BBCH 73-79) deutlich von den anderen Standort/Sorte-Kombinationen ab, bei denen das Expressionsmaximum deutlich niedriger lag bzw. kein klarer Höchstwert vorzuweisen war. Die DON-Gehalte von *Fusarium* in Weizen hatten grundsätzlich die selbe Tendenz wie die Proben aus 2004, jedoch traten auch hier deutliche Schwankungen auf.

3.8 Statistische Auswertung

3.8.1 Korrelation der zeitlichen Verläufe

Um einen möglichen statistischen Zusammenhang zwischen den zeitlichen Verläufen des DON-Gehalts, der gemessenen *F. graminearum*-DNA und dem DNA-Gehalt der Trichothecenbildner zu bestimmen, wurden die Chargen-Mittelwerte der jeweiligen Untersuchung einem Korrelationstest unterzogen.

Im Folgenden sind die Korrelationen nach den einzelnen Untersuchungsmethoden (Gehalt an Trichothecenproduzenten-DNA, *F. graminearum*-DNA und DON-Gehalt) dargestellt.

3.8.1.1 Trichothecenproduzenten-DNA

In Tab. 11 ist die Korrelation der DNA-Gehalte von Trichothecenproduzenten nach Standort und Sorte in den Jahren 2004 und 2005 aufgeschlüsselt.

Das Bestimmtheitsmaß war innerhalb einer Sorte 2004 hoch (0,88- 0,85) (Tab. 11). 2005 wies das Bestimmtheitsmaß insgesamt niedrigere Werte auf als 2004, auch innerhalb der Sorten.

Tab. 11: Korrelationen der zeitlichen Verläufe bei der Trichotheceproduzenten-DNA in Weizen.

Dargestellt sind die Kombinationen der verschiedenen Standorte und die beiden Sorten mit dem jeweiligen p-Wert und dem entsprechenden Bestimmtheitsmaß (R^2) aufgetrennt nach Jahren. C = `Complet`, P = `Petrus`, F = Frankendorf, O = Osterseeon, 04 = 2004, 05 = 2005, tri5-DNA = Trichothecebildner-DNA.

2004	C, F, 04, tri5-DNA x	C, F, 04, tri5-DNA x	C, O, 04, tri5-DNA x	P, O, 04, tri5-DNA x
	C, O, 04, tri5-DNA	P, F, 04, tri5-DNA	P, O, 04, tri5-DNA	P, F, 04, tri5-DNA
p-Wert	<0,0001	0,0029	<0,0001	<0,0001
R ²	0,848948	0,535327	0,818877	0,881860
2005	C, F, 05, tri5-DNA x	C, F, 05, tri5-DNA x	C, O, 05, tri5-DNA x	P, O, 05, tri5-DNA x
	C, O, 05, tri5-DNA	P, F, 05, tri5-DNA	P, O, 05, tri5-DNA	P, F, 05, tri5-DNA
p-Wert	<0,0001	<0,0001	0,0075	0,0001
R ²	0,758766	0,794089	0,410000	0,654743

3.8.1.2 Trichotheceproduzenten-DNA zu *F. graminearum*-DNA

Die Berechnung der Korrelation zwischen den zeitlichen Verläufen der Trichothecebildner-DNA und der DNA von *F. graminearum* ist in Tab. 12 nach den Kombinationen Standort-Sorte und Jahr gegliedert dargestellt.

In Tab. 12 wird deutlich, dass ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$) zwischen den zeitlichen Verläufen von *F. graminearum*-DNA und Trichothecebildnern-DNA besteht.

Tab. 12: Korrelation der zeitlichen Verläufe von Trichothecenproduzenten-DNA und *F. graminearum*-DNA in Weizen

Dargestellt sind jeweils die Korrelationen von Trichothecenbildner-DNA und *F. graminearum*-DNA an einem Standort und einer Sorte mit dem jeweiligen p-Wert und dem entsprechenden Bestimmtheitsmaß (R^2) aufgetrennt nach Jahren. C = 'Complet', P = 'Petrus', F = Frankendorf, O = Osterseeon, 04 = 2004, 05 = 2005, F.gra = *F. graminearum*-DNA, tri5-DNA = Trichothecenbildner-DNA.

2004	C, F, 04, <i>tri5</i> -DNA	C, O, 04, <i>tri5</i> -DNA	P, F, 04, <i>tri5</i> -DNA	P, O, 04, <i>tri5</i> -DNA
	x	x	x	x
	C, F, 04, F.gra	C, O, 04, F.gra	P, F, 04, F.gra	P, O, 04, F.gra
p-Wert	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R^2	0,781841	0,921746	0,948416	0,953052
2005	C, F, 05, <i>tri5</i> -DNA	C, O, 05, <i>tri5</i> -DNA	P, F, 05, <i>tri5</i> -DNA	P, O, 05, <i>tri5</i> -DNA
	x	x	x	x
	C, F, 05, F.gra	C, O, 05, F.gra	P, F, 05, F.gra	P, O, 05, F.gra
p-Wert	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004
R^2	0,925495	0,783169	0,908116	0,734473

3.8.1.3 Expression des *tri5*-Genes

Bei der Korrelationsberechnung der Expression des *tri5*-Genes konnte kein statistischer Zusammenhang auf $p < 0,05$ festgestellt werden. Die unterschiedlichen Kombinationen von Sorte und Standort wiesen in beiden Jahren keine Korrelationen auf. Die zeitlichen Verläufe zeigten statistisch betrachtet keine Gemeinsamkeiten.

3.8.1.4 DON-Gehalte

Die statistischen Berechnungen der Korrelationen zwischen den verschiedenen Sorten/Standort-Kombinationen bezüglich des DON-Gehaltes sind in Tab. 13 nach Jahren aufgetrennt. Dabei sind sowohl der p-Wert als auch das Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben.

In 2004 lag das Bestimmtheitsmaß innerhalb einer Sorte an verschiedenen Standorten deutlich höher (0,87 - 0,88), als zwischen den Sorten an einem Standort (0,45 - 0,72) (Tab. 13). Die zeitlichen Verläufe der DON-Gehalte innerhalb einer Sorte ließen somit eine Korrelation auf hohem Signifikanzniveau ($p < 0,05$) erkennen.

Anders war die Situation in 2005. Die zeitlichen Verläufe der DON-Gehalte in den Ähren wiesen nur ein geringes Bestimmtheitsmaß (0,19 - 0,33) auf (Tab. 13).

Tab. 13: Korrelationen der zeitlichen Verläufe von DON-Gehalten in Weizen.

Dargestellt sind die Kombinationen an einem Standort die verschiedene Sorten und eine Sorte an verschiedenen Standorten mit dem jeweiligen p-Wert und dem entsprechenden Bestimmtheitsmaß (R^2) aufgetrennt nach Jahren. C = 'Complet', P = 'Petrus', F = Frankendorf, O = Osterseeon, 04 = 2004, 05 = 2005. DON = DON-Gehalte in Weizen.

2004	C, F, 04, DON	C, F, 04, DON	C, O, 04, DON	P, O, 04, DON
	x	x	x	x
	C, O, 04, DON	P, F, 04, DON	P, O, 04, DON	P, F, 04, DON
p-Wert	<0,0001	0,0117	<0,0001	<0,0001
R ²	0,869889	0,452573	0,718031	0,881757
2005	C, F, 05, DON	C, F, 05, DON	C, O, 05, DON	P, O, 05, DON
	x	x	x	x
	C, O, 05, DON	P, F, 05, DON	P, O, 05, DON	P, F, 05, DON
p-Wert	0,0718	0,0386	0,0965	0,1388
R ²	0,265020	0,334063	0,230942	0,188057

3.8.2 Überprüfung der Signifikanz der Einflussfaktoren Standort, Sorte und Jahr auf die Befallsentwicklung

Um besser erkennen zu können welche Faktoren einen Einfluss auf die untersuchten Parameter (Gehalt an *F. graminearum*- und Trichothecenbildner-DNA und DON-Gehalt) bewirkten, wurden die SAS Prozedur mit 'proc glm' mit der Option 'tukey lines' durchgeführt. (2.4.2).

In Tab. 14 sind die Daten der *F. graminearum*-DNA, der DNA von Trichothecenbildnern und des DON-Gehaltes nach den verschiedenen Aspekten dargestellt.

Für den Standort Frankendorf (Tab. 14) wurde ein signifikanter Einfluss der Sorte auf alle drei Parameter festgestellt. Am Standort Osterseeon bewirkte zusätzlich das Jahr bei allen Untersuchungsparametern einen signifikanten Unterschied.

Tab. 14: Übersicht über die signifikanten Einflussfaktoren auf die zeitliche Entwicklung von *F. graminearum*- und Trichothecenbildner-DNA und den DON-Gehalt.

Die Berechnungen wurden mit dem Tukey-Kramer-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind jeweils nach dem untersuchten Parameter (*F. graminearum*-DNA, Trichothecenbildner-DNA und DON-Gehalt) und Einflussfaktor (Standort, Sorte und Jahr) gegliedert. Angegeben sind nur die Faktoren, deren Einfluss in der entsprechenden Betrachtung auf einem Niveau von 5 % signifikant waren.

Tukey-Kramer Test getestet auf 5 %		<i>F. graminearum</i> - DNA-Gehalt	DNA-Gehalt von Trichothecenbild- nern	DON-Gehalt
Standort	Frankendorf	Sorte	Sorte	Sorte
	Osterseeon	Jahr Sorte	Jahr Sorte	Jahr Sorte
Sorte	`Complet´	Jahr Standort	Jahr Standort	Jahr Standort
	`Petrus´	Jahr Standort	Jahr	Jahr
Jahr	2004	Sorte	Sorte	Sorte
	2005	Sorte Standort	Sorte Standort	Sorte Standort

Die untersuchten Parameter in der Sorte `Complet´ waren von den Faktoren Jahr und Standort beeinflusst. Wohingegen der Trichothecenbildner-DNA- und der DON-Gehalt in `Petrus´ nur von den entsprechenden Jahren beeinflusst wurde.

2004 als auch 2005 hatte jeweils die Sorte einen signifikanten Einfluss auf *F. graminearum*-DNA-, Trichothecenproduzenten-DNA- und DON-Gehalt. Im Jahr 2005 war zusätzlich der Faktor Standort für den Befall mit Fusarien entscheidend.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei den drei untersuchten Parametern (*F. graminearum*-DNA-, Trichothecenproduzenten-DNA- und DON-Gehalt). Ein Unterschied zwischen dem Befall der Sorten bestätigt werden konnte. Am Standort Osterseeon war ein deutlicher Unterschied in der *Fusarium*-Belastung zwischen den Jahren 2004 und 2005 zu erkennen, welcher beim Befall der Sorte `Petrus´ am deutlichsten wurde.

Um sich auch grafisch einen Eindruck über die mit dem Tukey-Kramer-Test berechneten Werte verschaffen zu können, wurden im Anhang (5.6) exemplarisch die Untersuchungen auf *F. graminearum*-DNA dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen auf *F. graminearum*- und Trichothecenproduzenten-DNA in Weizen

4.1.1 Nachweismethode und Vorkommen der DNA von Trichothecenproduzenten auf Weizenblättern

Konidiosporen von *Fusarium* spp. lassen sich über Regentropfen auf die unterschiedlichen Blattetagen bis zur Ähre im Bestand übertragen (Rossi et al., 2002; Paul et al., 2004; Lovell et al., 2002; Obst und Bechtel, 2000). Es war daher anzunehmen, dass auf den Blättern der unterschiedlichen Blattetagen *Fusarium*-DNA mit einer sehr sensitiven Methode nachgewiesen werden könnte. Aus diesem Grund wurden die Blattetagen F und F-1 mit der Realtime-PCR auf das Vorkommen Trichothecen-produzierender *Fusarium*-Arten untersucht. Dabei konnten bei den Blättern nur sehr geringe Mengen an Trichothecenproduzenten-DNA nachgewiesen werden und die Ergebnisse waren nicht reproduzierbar. Allerdings gelang es, durch konventionelle Methodik (Auslegen der Blätter auf Nährmedium, 1-wöchige Kultur und anschließende mikroskopische Auswertung) *Fusarium* spp. auf einzelnen Blättern aus den gleichen Versuchsflächen semiquantitativ nachzuweisen. Es war jedoch nicht möglich diese konventionell untersuchten Blätter nach der einwöchigen Inkubation anschließend noch in der PCR-Analyse zu verwenden. Die Verschiebung der Auswertung um eine Woche, welche sich durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden ergab, könnte Ursache für die differenten Ergebnisse gewesen sein. So wurden mit der PCR die Untersuchungen unmittelbar nach der Probennahme durchgeführt, wohingegen mit der konventionellen Methodik ein Ergebnis nach etwa einer Woche vorlag. In dieser Woche konnten Sporen keimen und der Pilz hatte Zeit zu wachsen. Eine weitere Ursache für negative Resultate bei der PCR für Trichothecen-produzierende *Fusarium*-Arten könnte die Untersuchung der Mischproben sein. Die vorhandene DNA-Menge dieser befallenen Blätter könnte durch die Vermischung von zehn Blättern unter der Nachweisgrenze gelegen haben. Zudem können Konidiosporen auf den nährstoffarmen Blattoberflächen nur sehr schwer keimen und dadurch auch kein Myzel, welches zu höheren *Fusarium*-DNA-Gehalten führen würde, ausbilden (Beyer et al., 2004).

Es stellt sich letztlich die Frage, inwieweit der Weg der Übertragung mit Konidiosporen, die mit der PCR nicht und mit der konventionellen Methode nur auf einzelnen Blättern gefunden wurden, für einen starken Befall der Ähren ausreicht. In Sporenfallen werden etwa doppelt so viele Askosporen wie Konidiosporen gezählt (Markell und Francl, 2003).

Zudem keimen Askosporen auf Ähren deutlich schneller als Konidiosporen (Markell und Francl, 2003). Daher ist es wahrscheinlicher, dass die Hauptinfektion der Ähren über Askosporen erfolgt und die Konidiosporen lediglich eine untergeordnete Rolle spielen.

4.1.2 Vorkommen der *F. graminearum*- und Trichothecenproduzenten-DNA in Weizenähren

In Bayern stellt *F. graminearum* den Hauptverursacher der fusariellen Taubährigkeit bei Weizen dar (Büttner, 2006). Da bei der Produktion von Trichothecenen jedoch mehrere *Fusarium*-Arten beteiligt sind, wie zum Beispiel *F. graminearum* und *F. culmorum* (Schnerr, 2002), sollte nicht nur *F. graminearum* sondern alle möglichen Trichothecen-Bildner erfasst werden. Für die Erfassung sämtlicher Trichothecen-Produzenten wurde eine Realtime-PCR mit dem Farbstoff SYBR Green I für das Schlüsselgen der Trichothecensynthese *tri5* entwickelt. Um den Anteil von *F. graminearum* an dieser Gruppe abschätzen zu können, wurde eine spezifische Realtime-PCR mit einer Taqman-Sonde für diese *Fusarium*-Art verwendet. Diese beiden PCR-Methoden wurden parallel zur Untersuchung der von ca. Mitte der Blüte bis zur Ernte (BBCH 65 - 100) gezogenen Proben eingesetzt. Der Befallsverlauf gemessen an der DNA der Trichothecenproduzenten zeigte eine hohe Korrelation mit dem Verlauf der *F. graminearum*-DNA. Des Weiteren erreichten auch die mit beiden Methoden festgestellten DNA-Konzentrationen ein vergleichbares Niveau. Dadurch liegt der Schluss nahe, dass *F. graminearum* der hauptsächliche Produzent von Trichothecenen im vorliegenden Versuch war. Auch in anderen Arbeiten über *Fusarium* in Bayern wurde *F. graminearum* als DON-Hauptproduzent nachgewiesen (Eiblmeier und Lepschy, 2007; Rodemann und Bartels, 2004).

Die gute Übereinstimmung der mit verschiedenen Detektionsmethoden erarbeiteten Ergebnisse bestätigt diese damit zugleich.

Bereits während der Weizenblüte wurden die ersten positiven Messergebnisse bei Trichothecenbildner- und *F. graminearum*-DNA erhalten. Obwohl der Trend der Befallsentwicklung gemessen am DNA-Gehalt im Weizen einen deutlichen Anstieg beschrieb, waren jedoch besonders in der frühen Phase bis etwa zur Teigreife (BBCH 86) Schwankungen zu erkennen. Vermutlich war die Befallsverteilung der Ähren innerhalb der Versuchsfelder zu Beginn noch inhomogen und die in einer Mischprobe enthaltene Anzahl befallener Ähren schwankte unregelmäßig von Probe zu Probe. Dafür sprachen auch in den späteren Entwicklungsstadien des Weizens der gleichmäßigere Anstieg der gemessenen Trichothecenproduzenten- und *F. graminearum*-DNA-Konzentration in der Ähre und die

geringeren Standardabweichungen. Hätte, was eine weitere Möglichkeit darstellte, die Extraktionseffizienz stärkere Unterschiede gezeigt, hätte die Standardabweichung in allen Entwicklungsstufen des Weizens einen vergleichbaren Wert aufweisen müssen. Dies war jedoch, wie bereits oben angesprochen, nicht der Fall.

Während sich 2004 Unterschiede der Pilz-DNA-Gehalte im Weizen vor allem zwischen den Sorten zeigten, traten 2005 zusätzlich Standortunterschiede auf. Eine mögliche Ursache für die Standortunterschiede 2005 könnte in den Einflüssen der Witterung gelegen haben. Bei *in vitro* Versuchen mit *F. graminearum* auf Weizenkörnern konnte ein deutlicher Einfluss der Feuchte und auch der Temperatur auf das Wachstum festgestellt werden (Hope et al., 2005). Die signifikanten statistischen Einflüsse der Standorte und auch der Jahre auf die zeitlichen Verläufe der DNA-Gehalte von Trichothecenbildnern legen nahe, dass die Witterungsbedingungen (siehe 5.1) eine erhebliche Wirkung auch auf das Wachstum des Pilzes in der Pflanze hatten.

Weshalb bei manchen Sorte/Standort/Jahr-Kombinationen gegen Ende der Getreideabreife eine tendenzielle Abnahme der DNA-Konzentration von Trichothecenbildnern zu erkennen war, ist zu klären. Ein Aspekt ist, dass die Messungen der DNA-Konzentration von Trichothecenproduzenten stets im Verhältnis zur Pflanzenmasse standen. Die Ährenmasse nimmt bedingt durch einen steigenden Stärkegehalt bis zur Körnerreife kontinuierlich zu (Kübler, 1994), so dass es zu einer Verdünnung der Pilz-DNA kommen könnte. Daher wäre es sinnvoll den Anteil der Weizen-DNA in den Proben während der Kornausbildung zu überprüfen. In einer Arbeit von Winton et al. (2002) über das Vorkommen von Pilz-DNA im Vergleich zur DNA der befallenen Pflanze, konnte gezeigt werden, dass sich der Anteil der Pilz-DNA innerhalb von 13 Monaten deutlich erhöhte. Eine weitere Ursache für die leichte Abnahme der *Fusarium*-DNA-Gehalte könnte ein Abbau durch Bakterien und andere Mikroorganismen (Höhn et al., 2002) gewesen sein.

Die Messungen von Trichothecenproduzenten-DNA und *F. graminearum*-DNA bestätigten sich in ihren zeitlichen Verläufen gegenseitig. Für die Schwankungen der gemessenen Pilz-DNA im Weizen zu Beginn der Pathogenese und die gleichzeitigen erhöhten Standardabweichungen war die Ursache vermutlich die inhomogene Befallsverteilung in den Versuchsflächen zu Beginn der Ährenentwicklung. Für die, in einigen zeitlichen Verläufen der Trichothecenbildnern-DNA festgestellte, tendenzielle DNA-Abnahme gegen Ende der Kornreife könnte eine Verschiebung des Probenvolumens (10 mg) aufgrund der ver-

änderten Ährenmasse verantwortlich sein. Auch ein Abbau durch Mikroorganismen konnte nicht ausgeschlossen werden.

4.2 Bedeutung und Entwicklung des Gehalts von DON in Weizenähren

4.2.1 Anstieg des Toxingehaltes in Weizenähren

Um den Gehalt an DON in den Ährenproben, welche auch parallel auf den DNA-Gehalt von Trichothecenbildnern und das Expressionsverhältnis des *tri5*- und *bt2*-Gens untersucht wurden, zu ermitteln wurde ein ELISA-Assay angewendet. Der DON-Gehalt in den Weizenproben aus 2004 stieg an beiden Standorten und bei beiden Sorten von Ende Blüte bis Mitte Milchreife deutlich an. Danach wurden bis zur Ernte keine größeren Änderungen im DON-Gehalt verzeichnet. Lediglich eine leichte Absenkung war zu erkennen, wie auch Prom et al. (1999) bei ihren Messungen bemerkten. Höhn et al. (2002) konnten ebenso in einigen Fällen eine Abnahme des DON-Gehaltes in den Ähren gegen Ende der Probenahmeperiode feststellen. Sie vermuteten, dass die Ursache in einer „enzymatischen Metabolisierung durch die Pflanze oder den Pilz selbst, sowie im Abbau durch Bakterien und andere Mikroorganismen“ liegen könnte. 2005 war der zeitliche Verlauf der Toxingehalte in den Weizenproben weniger konstant. Dennoch wurde ein deutlicher DON-Anstieg bei der anfälligen Sorte `Complet´ bis zur Teigreife festgestellt. Auch bei `Petrus´ erfolgte ein klarer Anstieg der DON-Gehalte im Verlauf der Vegetationsperiode des Weizens, wenn auch auf niedrigerem Niveau und weniger ausgeprägt als bei der anfälligen Sorte. Die DON-Gehalte entwickelten sich 2005 bei beiden Sorten in Abhängigkeit vom Standort unterschiedlich. Die signifikanten Unterschiede, welche sich zwischen den DON-Gehalten im Jahr 2005 an den beiden Standorten ergaben, waren vermutlich auf die unterschiedliche Witterung an den beiden Standorten zurückzuführen (siehe 5.1). So berichteten Hope et al. (2005) von unterschiedlichen DON-Gehalten bei verschiedenen Wachstumsbedingungen für *F. graminearum* und *F. culmorum*. Schaafsma et al. (2001) berechneten, dass das Anbaujahr einen Effekt von 48 % auf den Befallsgrad ausübte. Auch Cumaragun und Miedaner (2004) berichteten, dass unter anderem die Umwelt einen entscheidenden Faktor bei der DON-Produktion darstellte.

Obwohl handgeerntete Proben als am repräsentativsten (Schaafsma et al., 2001) gelten, wurden bei geringeren DON-Gehalten zu Beginn der Probennahme starke Standardabweichungen festgestellt. Vermutlich lag die Ursache in der anfänglich geringen Befallshäufigkeit in den Ähren, die auch zu einer größeren Streuung der DON-Werte führt. Ein wei-

terer Grund könnte möglicherweise der ungleiche Anteil DON-belasteter Körner in den einzelnen Ähren gewesen sein. Lepschy und Gensler (2001) stellten fest, dass die Verteilung der DON-Werte mit steigendem Toxin-Gehalt immer homogener wurde. Die geringen statistischen Schwankungen bei höheren DON-Gehalten könnten auch darauf beruhen, dass DON-Werte (2,19 ppm) ausserhalb des linearen Bereichs der verwendeten Standardkurve lagen. Daher war es möglich, dass die höchsten gemessenen DON-Werte nicht den wahren Toxin-Gehalten entsprachen. Dies führte möglicherweise auch dazu, dass die Standardabweichung nur noch kleine Schwankungen aufwies. Obwohl bei den am höchsten mit DON-belasteten Proben der tatsächliche Toxin-Gehalt wegen Überschreitung des linearen ELISA-Messbereichs unterschätzt wird, ist der zeitliche Verlauf der DON-Belastung mit anderen Arbeiten vergleichbar (Ludewig et al., 2005b; Mayer et al., 2003; Wanyoike et al., 2002; Prom et al., 1999). Eine exakte Bestimmung der hohen DON-Gehalte in den Ähren durch die Untersuchung mit verdünnten Proben wurde aus Kostengründen nicht vorgenommen.

Somit waren die Schwankungen im zeitlichen Verlauf der DON-Werte vermutlich auf Witterungseinflüsse und Sortenunterschiede mit jeweils unterschiedlichen Abwehrreaktionen der Pflanze zurückzuführen. Die hohe Standardabweichung während des starken Toxinanstiegs beruhte vermutlich auf die noch inhomogene Verteilung der befallenen Ähren im Feld.

4.2.2 Bedeutung DONs für die Etablierung von *Fusarium* in Weizen

Kurz nach der Blüte und somit kurz nach der Ähreninfektion konnte sowohl 2004 als auch 2005 ein starker Anstieg des DON-Gehaltes verzeichnet werden. In späteren Entwicklungsstufen des Weizens war der Anstieg des DON-Gehaltes deutlich geringer. Parallel dazu verlangsamte sich das Pilz-Wachstum, wie aus dem Vorkommen von *F. graminearum*- und der Trichothecenbildner-DNA ersichtlich ist. Auch erfolgte 2004 ein leichter Abfall der DON-Werte im Weizen kurz vor der Ernte. Die zeitlichen Verläufe der DON-Gehalte dieser Arbeit sind vergleichbar mit den Ergebnissen von Ludewig et al. (2005b) und Prom et al. (1999). Die gewonnenen Ergebnisse bestätigen die zuvor (1.2.3) erwähnte Vermutung, dass DON eine entscheidende Bedeutung für die Etablierung des Pilzes im pflanzlichen Gewebe hat. Gerade zu Beginn der Pathogenese scheint die Schwächung der pflanzlichen Abwehr für das Eindringen des Pilzes in die Pflanze bedeutsam zu sein (Eudes et al., 2001; Miller und Ewen, 1997).

Zwischen den beiden Winterweizen-Sorten `Complet´ und `Petrus´ waren in beiden Jahren (2004 und 2005) signifikante Unterschiede im DON-Gehalt feststellbar. Dabei wies `Complet´ eine höhere DON-Belastung als `Petrus´ auf. Dies spiegelt die unterschiedliche Anfälligkeit der Weizensorten gegenüber *Fusarium* spp. wieder (Eudes et al., 2001; Miller und Ewen, 1997; Ludewig et al., 2005a). So ist bekannt, dass manche Winterweizen Sorten, welche als unempfindlich gegenüber *Fusarium* gelten, verschiedene Resistenzmechanismen (Gosman et al., 2005) entwickelt haben. Davon wirken manche dem Pilzwachstum entgegen, wie z. B. bei `Petrus´ beobachtet wurde (Siranidou et al., 2002). Bei diesen wenig anfälligen Sorten wird auch eine hohe Toleranz gegenüber DON beobachtet (Miller und Ewen, 1997; Gosman et al., 2005). Ebenso war bei manchen Sorten ein geringer Abbau von DON festgestellt worden (Miller und Ewen, 1997). Dies könnte die vorübergehende Absenkung des DON-Gehaltes bei `Petrus´ in Frankendorf 2004 erklären. Schaafsma et al. (2001) berechneten in ihrer Arbeit jedoch, dass der Sorteneinfluss bei den unterschiedlichen Verläufen des DON-Gehaltes lediglich zu 27 % beiträgt.

Der starke Anstieg der Toxingehalte zu Beginn der Pilz-Infektion, konnte die wichtige Stellung DONs bei der frühen und mittleren Pathogenese bestätigen. Zudem konnten neue Informationen über den zeitlichen Verlauf des DON-Gehaltes in Weizen gewonnen werden.

4.2.3 Zusammenhang zwischen DON-Gehalt und Anteil an *Fusarium*-DNA

Zwischen dem gemessenen *Fusarium*-DNA-Gehalt und dem DON-Gehalt lässt sich auch in anderen Arbeiten ein Zusammenhang erkennen (Cumagun et al., 2004). So wurde im geernteten Weizen ein deutlicher Zusammenhang zwischen DON-Gehalt und quantitativ bestimmter *F. graminearum*-DNA festgestellt (Schnerr et al., 2002). In Gerste konnte ebenfalls bei der Ernte sowohl ein hohe Korrelation zwischen DON- und DNA-Gehalt der Trichothecen-Produzenten, als auch zwischen DON- und *F. graminearum*-DNA-Gehalt, errechnet werden (Sarlin et al., 2006). Allerdings kamen dabei die höchsten Korrelationen nur in künstlich inokulierten Gerstenproben vor. Ein Grund dafür könnten die unterschiedlichen *Fusarium*-Stämme sein, die im unterschiedlichen Maße Toxine produzieren, welche bei einer natürlichen Inokulation auf dem Feld auftreten und dadurch unterschiedlich ausgeprägte Korrelationen bewirken könnten (Schnerr et al., 2002). Bei all diesen Arbeiten wurde der Toxin- und *Fusarium*-DNA-Gehalt nach der Ernte nur einmalig ermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch über einen Zeitraum von der Blüte bis zur Ernte in Abständen von 3-4 Tagen der Toxin- und *Fusarium*-DNA-Status des Weizens auf dem Feld

erfasst. Eine Berechnung der Korrelation zwischen der zeitlichen Entwicklung des DON-Gehaltes und des Anteils an Pilz-DNA gestaltete sich aufgrund der unterschiedlichen zeitlichen Entwicklungen schwierig. Um eine Aussage über die Resistenzausprägung der Weizensorte zu gewinnen, bildeten Gosman et al. (2005) den Quotienten aus DON-Gehalt und Pilz-DNA-Anteil. Dabei nahmen sie an, dass Weizensorten mit einer geringeren Anfälligkeit gegenüber *Fusarium* weniger DON pro Pilz-DNA enthalten. Demnach müsste das Verhältnis DON/Pilz-DNA mit steigender *Fusarium*-Anfälligkeit steigen. Aber auch hier wurden in der genannten Arbeit lediglich Körner von zwei Weizen-Sorten (anfällig und weniger anfällig), die in Töpfen unter kontrollierten Bedingungen inokuliert und kultiviert wurden, einmalig untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde für das Jahr 2004, wenn lediglich die Ernteproben verwendet wurden, ein ähnlicher Trend festgestellt. Jedoch konnte dieser für 2005 nicht bestätigt werden. Eine einmalige Bestimmung der Anfälligkeit der Weizensorte über das Verhältnis von DON-Gehalt zu Pilz-DNA-Anteil erscheint folglich nicht ausreichend. Vielmehr gestaltet sich das Zusammenspiel zwischen *Fusarium* und Weizen komplexer (Höhn et al., 2002). Einen Einflussfaktor stellen die Witterungseinflüsse dar. Ergebnisse von Hope et al. (2005) deuten auf einen großen Einfluss von Umweltbedingungen auf das Pilzwachstum und die Mykotoxinbildung hin. Sie beschreiben die unterschiedlichen Reaktionen von *F. graminearum*-Wachstum und die Entwicklung der DON-Gehalte in Abhängigkeit von Feuchte und Temperatur. So war erst ab einer a_w von $>0,9$ bei optimaler Temperatur (25°C) eine Produktion von DON zu verzeichnen, wohingegen *F. graminearum* bereits ab einer Temperatur von 15°C zu wachsen beginnt. Sie konnten keinen Zusammenhang zwischen Myzelwachstum und Toxinproduktion feststellen. Höhn et al. (2002) berichteten von ähnlichen Beobachtungen. Diese Einflüsse, welche bei unterschiedlichen Boden- und Klimabedingungen an den Standorten verschiedener Jahre auftreten, spielten auch in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Rolle (siehe Tab. 14 und 5.1). Wenn nicht nur der Erntezeitpunkt betrachtet wurde, sondern auch der zeitliche Verlauf, ließen sich Übereinstimmungen zwischen DON-Gehalt und quantifizierter *Fusarium*-DNA finden. So fand sich bei einem relativ großen Anteil der Proben mit hohem Toxin-Gehalt ein vergleichsweise hoher Gehalt an *Fusarium*-DNA. Diese Übereinstimmungen sprachen für einen Zusammenhang von *Fusarium*-Infektion und DON-Bildung. Der zu Beginn der Pathogenese schneller als der Pilz-DNA-Gehalt ansteigende Toxingehalt in der Ähre könnte möglicherweise (siehe 4.2.2) Kennzeichen für das Eindringen des Pilzes in das pflanzliche Gewebe sein.

Die Korrelation zwischen dem DON-Gehalt und dem Anteil an *Fusarium*-DNA in Weizenähren ist bei natürlich infizierten Pflanzen etwas geringer als bei künstlich inokulierten. Mit einfachen Modellen lässt sich dieser Zusammenhang jedoch nicht immer erklären. Vielmehr ist das Zusammenspiel zwischen *Fusarium*-Wachstum und pflanzlicher Pathogenabwehr vielschichtiger. Die Umweltfaktoren und Pflanzeigenschaften spielen dabei eine bedeutsame Rolle.

4.3 Zeitliche Entwicklung der *tri5*-Gen-Expression von *Fusarium* in Weizenähren

In der vorliegenden Arbeit wurden über ca. 57 Tage in 3-4 Tages-Abständen die Expression des *tri5*-Gens im Verhältnis zum *bt2*-Gen gemessen. Die Expression des *tri5*-Gens, eines der Schlüsselgene in der Biosynthesekette von DON, wurde mit Realtime-PCR untersucht. Dabei wurde SYBR Green I als Fluoreszenz-Farbstoff verwendet. Zur internen Kontrolle diente das *bt2*-Gen. Die bei der Realtime-PCR ermittelten cDNA-Gehalte des *tri5*-Gens wurden stets auf den cDNA-Gehalt des *bt2*-Gens bezogen, da bei der RNA-Isolierung und der RT-PCR Effizienz-Schwankungen auftreten können (Schmittgen und Zakrajsek, 2000). Dabei wurde aus Ziel- und Referenzgen-cDNA-Gehalt jeweils das Verhältnis (Ratio) gebildet. Bei den meisten Sorte/Standort/Jahr-Kombinationen war ein deutlicher Höchstwert der Expression zwischen der frühen und mittleren Milchreife des Weizens (BBCH 71-76) zu erkennen. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Voigt et al. (2007) bei *F. graminearum* in Weizenähren während eines Beobachtungszeitraums von 14 Tagen. 3 Tage nach der künstlichen Inokulation erfolgte beim Wildtyp von *F. graminearum* die höchste Expression beim *tri5*-Gen (mit *beta tubulin* als Referenzgen). Anschließend sank diese auf ein niedriges Niveau und zeigte keine weitere Steigung. Eine hohe Expression des *tri5*-Gens bei *F. culmorum* 10 Tage nach der künstlichen Inokulation und eine deutliche Abnahme dieser von Beobachtungs-Tag 10 bis 41, mit *beta tubulin* als Referenzgen, stellten Doohan et al. (1999) in *in planta*-Studien fest. Die zeitlichen Expressions-Verläufe der vorliegenden Arbeit spiegelten diesen Verlauf in etwa wieder. Im Unterschied zu den erwähnten Arbeiten jedoch, wurden in der vorliegenden Arbeit über einen längeren Zeitraum (ca. 57 Tage) in engeren/gleichmäßigeren Zeitintervallen (3-4 Tage) Proben genommen und die Expression des *tri5*-Gens analysiert. Zusätzlich erfolgten die Untersuchungen an natürlich inokulierten Weizenpflanzen, die bei natürlichen Bedingungen auf dem Feld kultiviert wurden. Da Cumagun und Miedaner (2003) Unterschiede zwischen Gewächshaus- und Freiland-Kulturen bei Aggressivitätsuntersuchungen feststellten,

kann angenommen werden, dass die hier gewonnenen Daten besser auf Praxisverhältnisse übertragen werden können. Die Unterschiede bezüglich des erreichten Niveaus beim Expressionshöchstwert waren vermutlich klimatisch bedingt. So wurde bereits in den vorherigen Abschnitten erläutert, in welchem Umfang die klimatischen Bedingungen, wie Temperatur und Feuchte, einen starken Einfluss auf Toxinbildung und Pilzwachstum ausüben. Die gemessenen Expressionen waren sehr stimmig mit den zeitlichen Verläufen von Trichothecenproduzenten-DNA und DON-Gehalt (siehe 3.7 und 5.5). So lag die *tri5*-Genexpression im zeitlichen Verlauf beispielsweise bei der anfälligeren Sorte 'Complet' an beiden Standorten im Jahr 2004 höhere als bei 'Petrus'. Auch im Jahre 2005, welches sich insgesamt ungleichmäßiger in den zeitlichen Verläufen zeigte, passten die Expressionen des *tri5*-Gens von *Fusarium* in Weizen zeitlich zu den ermittelten DON-Gehalt und DNA-Menge der Trichothecenproduzenten (siehe 3.7 und 5.5).

Die hohe Standardabweichung, welche sich bei einigen Probenahme-Terminen zeigte, könnte auf Unterschiede in der tageszeitlichen Expression zurückzuführen sein. Innerhalb eines Tages können die gemessenen Expressionen einzelner Gene erheblich schwanken (Geisen, mündl. 2007). Zwar wurden die Proben zur etwa gleichen Zeit am Vormittag genommen, jedoch ergaben sich manchmal Unterschiede von etwa einer Stunde. Ob diese einstündige Verzögerung eine derartige Standardabweichung erklären kann, ist fraglich. Generell ist eine gewisse experimentelle Schwankung unvermeidbar (Wong und Medrano, 2005). Zur Reduzierung der Schwankungen innerhalb eines PCR-Laufs wäre es sinnvoll gewesen, eine Probe mehrmals aufzutragen und aus den Ergebnissen einen Mittelwert zu berechnen. Bei den hier durchgeführten *tri5*-Expressionsanalysen wurde jede Probe für das *tri5*-Gen und das *bt2*-Gen nur zweimal aufgetragen, was zu einer größeren Schwankungsbreite der Ergebnisse geführt hat. Die Gründe für den Verzicht auf mehrere Wiederholungen lagen in dem ansonsten zu großen Umfang der Untersuchungen, gleichwohl wurden je Probennahmetermin 5 parallele Mischproben genommen. Daraus konnte ein Mittelwert berechnet werden, so dass die Repräsentanz der Einzelergebnisse gewährleistet ist.

Die Unterschiede, welche sich zwischen den einzelnen PCR-Läufen ergaben, wurden jeweils mit einem Kalibrator korrigiert (Wong und Medrano, 2005; Anonymus, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde bei allen PCR-Läufen das gleiche DNA-Extrakt von *F. graminearum* als Kalibrator mitaufgetragen. Obwohl der Kalibrator ein DNA-Isolat war und keine cDNA, konnten dadurch Unterschiede festgestellt und die untersuchten cDNA-

Werte mit dem jeweils ermittelten Faktor berichtigt werden. Da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen und Fehler bei der RT-PCR zu unterschiedlichen Gehalten an cDNA in einer Probe führen können, wurde eine interne Referenz verwendet, die als Bezugsgröße für die Berechnung der Genexpression diente (Pfaffl, 2004). Eine solche interne Referenz sollte ein Gen sein, welches möglichst gleichmäßig exprimiert wird. Die eben genannten Fehlerquellen beeinflussen dabei sowohl das Zielgen (*tri5*-Gen) als auch das Referenzgen (*bt2*-Gen) gleichermaßen. Durch das Beziehen der Ergebnisse auf das Referenzgen wurden die Ergebnisse um die möglichen Fehler bereinigt und die Varianz der Expression reduziert. Dieser Bezug des Zielgenes auf das Referenzgen wird als Normalisierung bezeichnet (Pfaffl, 2004). Die Expression eines internen Standards verläuft zwar weitgehend gleichmäßig, da aber die meisten „Houskeeping-Gene“ nicht nur an den grundlegenden Zellvorgängen sondern auch an weiteren Funktionen beteiligt sind, können auch Schwankungen in der Expression auftreten (Thellin et al., 1999). So empfahlen Vandesompele et al. (2002), Thellin et al. (1999) und Bustin und Nolan (2004) die Verwendung von mindestens zwei möglichst gleichmäßig exprimierten „Houskeeping-Genen“, um entsprechende Schwankungen erkennen zu können. Jedoch ist die Untersuchung der Proben mit mindestens zwei „Housekeeping-Genen“ sehr aufwändig (Wong und Medrano, 2005). Thellin et al. (1999) räumten die Verwendung nur eines Housekeeping-Genes ein, wenn aus anderen Arbeiten mit vergleichbarem Versuchsaufbau die gleichmäßige Expression dieses Referenzgenes bekannt ist. Das Gen für *bt2* stellt ein sehr gleichmäßig exprimiertes Gen dar und eignet sich daher grundsätzlich sehr gut als Referenzgen für die Expressionsuntersuchung in Pilzen (Konietzny und Greiner, 2003; Buhr und Dickman, 1994 und 1997; Shim und Woloshuk, 2001; Flaherty et al., 2003; Semighini et al., 2002; Benito et al., 1998). Die Expression in Pilzen wurde jedoch bislang nur über maximal 41 Tage nach künstlicher Inokulation unter kontrollierten Bedingungen beobachtet (Doohan et al., 1999; Voigt et al., 2007). Da aber auch an anderen Ascomyceten, wie *Aspergillus*, mit *bt2* als Referenzgen, ein ähnlicher Expressionsverlauf für ein toxinspezifisches Gen beobachtet werden kann (Mayer et al., 2003), darf davon ausgegangen werden, dass die hier vorgestellten Ergebnisse plausibel und aussagekräftig sind.

Um bei den Berechnungen der Expressionsverhältnisse (Ratio) die verschiedenen Effizienzen der PCR-Systeme für das *tri5*- und das *bt2*-Gen zu berücksichtigen, wurde bei jedem PCR-Lauf die Berechnung dieser über die entsprechende Standardkurve für das *tri5*- und das *bt2*-Gen nach Pfaffl (2004) durchgeführt. Nur bei den ersten PCR-Läufen

wurde, wie in 2.3.4.6 beschrieben, eine durchschnittliche Effizienz aus mehreren PCR-Läufen zur Berechnung der um die Effizienz korrigierten Expression verwendet. Durch diese Korrektur konnte eine Verzerrung der Ratio aufgrund möglicherweise unterschiedlicher PCR-Effizienzen vermieden werden. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Effizienzen wurden, entgegen der Empfehlung von Pfaffl (2004) eine Standardreihe aus cDNA-Proben zu verwenden, mit einer Standardreihe aus verdünnter, isolierter *F. graminearum*-DNA durchgeführt. Die cDNA-Mengen waren zu gering um zuverlässige Effizienzen auf die genannte Weise bestimmen zu können. Obwohl die berechneten und normalisierten Expressionsratios vermutlich Verzerrungen aufweisen, die im Einzelnen nicht abgeschätzt werden können, scheinen die in sich stimmigen Ergebnisse (siehe 3.4 und 3.7) plausibel und aussagekräftig zu sein.

Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte in jedem PCR-Lauf im Bezug auf ein Referenzgen, eine Standardreihe und einen Kalibrator unter Berücksichtigung der entsprechenden PCR-Effizienz. Die dabei ermittelten Expressionswerte der unterschiedlichen zeitlichen Verläufe waren zu den entsprechenden Trichothecenproduzenten-DNA- und DON-Gehalten in den Proben stimmig. Die beobachteten Schwankungen waren vermutlich biologischen Ursprungs, da zu Beginn der Infektion eine inhomogene Befallsverteilung vorlag. In anderen Arbeiten konnten die hier ermittelten Expressionsverläufe von *tri5* mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt werden. Es konnten damit neue Erkenntnisse über den zeitlichen Verlauf und die Ausprägung der *tri5*-Genexpression in natürlich inokuliertem Weizen, der bei natürlichen Bedingungen auf dem Feld kultiviert wurde, über einen längeren Zeitraum gewonnen werden.

4.4 Wechselwirkungen von *Fusarium* und Weizen

Die zeitlichen Verläufe vom Gehalt an Trichothecenbildner-DNA und DON, sowie die Expressionsverhältnisse des *tri5*-Gens zum *bt2*-Gen wurden in einer Grafik dargestellt. Dadurch wurden die zeitlichen Zusammenhänge zwischen diesen Entwicklungen deutlicher erkennbar (Abb. 31 und Abb. 32). Obwohl die Tendenzen grundsätzlich übereinstimmten (Zunahme DNA von Trichothecenbildnern und DON-Gehalt, vorübergehender Anstieg der *tri5*-Genexpression mit zum Teil deutlichem Maximum und darauffolgendem Absinken) waren besonders zwischen den Jahren Unterschiede festzustellen. Auch Prom et al. (1999) berichteten von Unterschieden bezüglich der Zunahme des DON-Gehaltes im zeitlichen Verlauf. So beobachteten sie in einem Jahr den stärksten Zuwachs an DON zwischen Weizenblüte und später Milchreife, wohingegen im folgenden Versuchsjahr der

deutlichste Anstieg im Toxinanteil zwischen Wachsreife und Ernte zu erkennen war. Sie führten dies auf unterschiedliche Witterungsbedingungen zurück. Nach einem Anstieg der *tri5*-Genexpression konnte in jedem Fall ein Anstieg des DON-Gehaltes festgestellt werden (3.7). Generell bewegten sich mit Ausnahme der *tri5*-Expression bei 'Complet' in Frankendorf die gemessenen Werte 2005 auf einem niedrigeren Niveau als 2004.

Die Interaktionen zwischen Pilz und Pflanze könnten bei den zeitlichen Verläufen von *Fusarium*-DNA, DON-Gehalt und Expression des *tri5*-Gens in der Pflanze eine entscheidende Rolle gespielt haben. Bei Weizen gibt es in den Sorten verschiedene Resistenzausprägungen und -typen. Auch können die Abwehrmechanismen unterschiedlicher Natur sein. Die 4 Resistenztypen von Weizen gegen *Fusarium* sind folgendermaßen beschrieben: Typ I - Initialinfektion wird blockiert, Typ II - die Ausbreitung des Pathogens im Pflanzengewebe ist verlangsamt, Typ III - die Pflanze ist in der Lage DON abzubauen, Typ IV - die Pflanze ist in der Lage DON zu tolerieren (Siranidou et al., 2002; Miller und Ewen, 1997). Über die in der vorliegenden Arbeit verwendete Winterweizen-Sorte 'Petrus', die sich im Befall signifikant von 'Complet' unterscheidet, ist bekannt, dass sie eine Typ II - Resistenz aufweist. Dies führt zu Zellwandverdickungen und Verdichtungen der Zellmembran. Zudem ist eine Anreicherung der phenolischen Bestandteile zu verzeichnen, welche einen toxischen Effekt auf manche *Fusarium*-Arten aufweisen. Dadurch wird eine Hemmung des Myzelwachstums erreicht. Einige dieser Abwehrmechanismen der Pflanze sind bereits 2 Tage nach der Infektion messbar (Siranidou et al., 2002). So wirkten diese Reaktionen sicherlich in die hier durchgeführten Messungen mit ein. Mesterhazy et al. (1999) berichten zudem darüber, dass eine moderate Resistenz im starken Maße von den Umweltbedingungen beeinflusst wird. Dadurch konnten auch die Schwankungen in den zeitlichen Verläufen der DNA von Trichothecenbildnern und auch die Standort-/Jahres-Unterschiede in den vorliegenden Untersuchungen erklärt werden. Die Abwehrreaktionen des Weizens sind durch die Witterungsbedingungen unterschiedlich stark ausgeprägt und führen dadurch zu Unterschieden in der Befallsentwicklung zwischen den Jahren, Standorten und auch den einzelnen Messterminen (Choo et al., 2004).

Da 2005 die Witterungsbedingungen (siehe 5.1) für *Fusarium* aufgrund der Ergebnisse als ungünstiger einzustufen waren, war es auch denkbar, dass die Etablierung des Pilzes sich in Schüben vollzog, was sich in den stärkeren Schwankungen des Trichothecenbildner-DNA- und DON-Gehaltes widerspiegelt. Die Pflanze war eventuell während günstigen Umweltbedingungen vital genug, um dem Pathogen immer wieder Widerstand zu bieten

und stoppte dadurch eventuell auch das Wachstum des Pilzes, während die Pflanze selbst weiterwuchs. Daher könnten diese Rückgänge in Trichothecenbildner-DNA- und DON-Gehalt auch auf ein verändertes Verhältnis Pflanzenmasse zu Pilzmasse bzw. Toxingehalt zurückgeführt werden. Fraglich blieb, inwieweit sich mit zunehmender Abreife die Abwehrreaktionen der Pflanze veränderten oder gänzlich eingestellt wurden.

Die Aktivitäten von *Fusarium* in der Pflanze hatten ebenfalls einen bedeutsamen Einfluss auf die Belastung mit DON und Pilz-Gewebe. Ein wichtiger Punkt war die Produktion von Mykotoxinen. So war über die Bedeutung und Wirkweise zahlreicher fusarieller Mykotoxine noch wenig bekannt, über die Wirkung von DON existierten jedoch einige Untersuchungen, die diese Vermutung belegten (Miller und Ewen, 1997; Goswami et al., 2006; Cumagun et al., 2004; Eudes et al., 2001). Da *F. graminearum*-Stämme, die kein Trichothecen produzierten, deutlich langsamer in Weizen wachsen konnten als Trichothecen-Produzenten (insbesondere DON), liegt die Vermutung nahe, dass DON für die Etablierung des Pilzes in der Pflanze eine wichtige Rolle spielt (Langevin et al., 2004). Eudes et al. (2001) vermuteten, dass bei Anwesenheit von Trichothecenen die Abwehrmechanismen der Pflanze verlangsamt werden würden. Da DON für die Etablierung von *Fusarium* sp. eine wichtige Rolle spielt, war es erklärlich, dass der DON-Gehalt in den Proben kurz nach der Infektion stark anstieg und nach erfolgreicher Etablierung kein weiteres DON gebildet wurde. Statt dessen wurde der Toxin-Gehalt in der Pflanze weitestgehend erhalten. Die Expression des *tri5*-Gens im Jahr 2004 bestätigt dies. Auch hier war zu Beginn der Etablierung ein deutlicher Expressionshöchstwert zu erkennen. Im weiteren zeitlichen Verlauf sank die Expression und es war kein weiterer Anstieg der Expression mehr festzustellen.

4.5 Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse für den Weizen-Anbau

4.5.1 Optimierung der Probenahme

Um für den Anbau sinnvolle und aussagekräftige Untersuchungen auf *Fusarium*-Belastung durchführen zu können, ist bereits die Probenahme auf dem Feld von entscheidender Bedeutung. Dabei gilt es unter Berücksichtigung von Bodenrelief, feldumgebenden Strukturen, wie zum Beispiel Hecken und Straßen, Feldgröße und eventuell bereits sichtbaren Befallsnestern, repräsentative Proben zu nehmen (Förschler, 2004). Der Probenumfang sollte sowohl passend zur Feldgröße gewählt werden, als auch die Probenahme nicht zu aufwändig sein. In zahlreichen Arbeitsgruppen wurde bereits versucht, die optimale

Strategie zur Probenahme im Feld zu entwickeln (Wilhelm und Jones, 2005; Prom et al., 1999), jedoch konnte bislang keine einheitliche internationale Empfehlung ausgegeben werden. Mit der hier verwendeten Methode, werden 10 parallele Misch-Proben, jeweils über die gesamte Versuchsfläche genommen, erhalten. Dabei zeigte sich jedoch, dass bereits auf dieser relativ kleinen und homogenen Fläche (30m x 30m) auffallende Unterschiede zwischen den 10 Wiederholungen auftreten können. Dies verdeutlicht, wie schwierig eine sinnvolle Probenahme für Anbauer auf größeren Feldern sein kann. Von Bayerischen Landwirtschaftsämtern wird im Allgemeinen die Empfehlung ausgesprochen, etwa 200 Ähren unter Berücksichtigung der genannten Einflussfaktoren über das Feld verteilt zu nehmen.

4.5.2 Bewertung der DON-Bestimmung

Aufgrund der nicht unerheblichen Kosten einer DON-Analyse wird für den Anbauer eine Untersuchung nur in konkreten Verdachtsmomenten sinnvoll sein. Die Analyse des DON-Gehaltes ist sowohl für die Abnehmer des Getreides, die Anbauer und auch für die Wissenschaft zur Erstellung von Prognosemodellen und Klärung epidemiologischer Fragen bedeutsam. Wenn für den Anbauer toxinreduzierende Fungizide erhältlich werden, ist eine Toxinanalyse einige Wochen vor der Ernte ein wichtiger Hinweis um den endgültigen Toxingehalt noch durch etwaige Fungizid-Spritzungen zu reduzieren. Bis dato sind jedoch keine derartigen Fungizide im Handel erhältlich, so dass derzeit eine Bestimmung des Toxingehaltes auf dem Feld für den Landwirt rein informativen Charakter besitzt. Vor dem Hintergrund der bestehenden DON-Höchstmengen-Verordnung für Getreide ist diese Information für viele eine wichtige Hilfe, da somit rechtzeitig alternative Verwendungsmöglichkeiten gesucht werden können. Für die Getreideabnehmer, wie Lagerhäuser und Mühlen, ist es von hoher Bedeutung rechtzeitig über die aktuelle Situation informiert zu werden, da sie somit in der Lage sind entsprechende Vorkehrungen zu treffen. Zur Erstellung der Prognosemodelle stellen die bereits vor der Ernte ermittelten Toxinwerte einen wichtigen Bestandteil in den Risikoberechnungen dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass ab etwa Gelbreife (BBCH 87) das bis dahin entwickelte Niveau des DON-Gehaltes mehr oder weniger konstant bleibt. Ob dieses Ergebnis auf andere Sorten, Standorte und Anbaujahre übertragen werden kann ist fraglich und sollte in weiteren Arbeiten geklärt werden.

4.5.3 Bestimmung der *Fusarium*-DNA als Frühindikation

Möglicherweise vorhandene *Fusarium*-DNA (aus Sporen und Myzel) schon während der Blüte im Bestand aufzuspüren kann wichtig sein, um frühzeitig entsprechende Empfehlungen für notwendige Fungizidapplikationen geben zu können. Mit Hilfe der entwickelten PCR-Systeme ist ein solcher Nachweis frühzeitig möglich. Derzeit ist die Datengrundlage dafür noch nicht ausreichend. Aus den hier präsentierten Daten war es auch noch nicht möglich von der gemessenen DNA von Trichothecenbildnern oder der *tri5*-Genexpression in den Weizenproben konkrete Rückschlüsse auf die zu erwartende DON-Belastung der Ähren zu ziehen.

4.5.4 Stand der Entwicklung von Prognosemodellen

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse sind notwendig, zur Schaffung einer ausreichenden Datenbasis für die Weiterentwicklung des *Fusarium*-Prognosemodells an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (<http://www.lfl.bayern.de/ips/pflanzenschutzhinweise/12410/>). Durch die parallel gewonnenen Wetterdaten aus dem bayerischen Agrarmeteorologischen Messnetz, den Ergebnissen aus den Sporenfallen, Exaktversuchen zur *Fusarium*-Bekämpfung und den hier präsentierten Daten konnten wertvolle Informationen über die komplexen Zusammenhänge zwischen *Fusarium*-Entwicklung in der Pflanze, Umwelteinflüsse, Sporenflug, anbauliche Maßnahmen und der Entwicklung von *Fusarium* in der Pflanze gewonnen werden. Von diesem entwickelten und laufend verbesserten Prognosemodell zur Risikobewertung bei *Fusarium*-Befall profitieren letztendlich Anbauer und Abnehmer gleichermaßen.

Die hier dargestellten Ergebnisse machen jedoch auch deutlich, dass Resistenzuntersuchungen bei neuen Weizen-Sorten auf nur einem Standort äußerst kritisch zu beurteilen sind. Wichtig wäre hier eine Testung auf mindestens zwei verschiedenen Standorten mit einer natürlichen Inokulation. Auch Miedaner und Reinbrecht (2001) kamen bei ihren Untersuchungen zu einem vergleichbaren Ergebnis.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung von *Fusarium*, in erster Linie *F. graminearum*, und parallel dazu die Produktion des Mykotoxins DON untersucht. Diesem Toxin wird derzeit aufgrund einer möglichen Gefährdung von Mensch und Tier durch *Fusarium*-belastetes Getreide am meisten Aufmerksamkeit zugewendet. Wie in dieser Arbeit deutlich wurde, sind die Zusammenhänge und Wechselwirkungen zwischen Wei-

zensorte, Anbaujahr und Standort sehr komplex. Dadurch ist es aufgrund von zwei untersuchten Sorten an zwei verschiedenen Standorten in zwei Anbaujahren nicht möglich zuverlässige Aussagen über die zu erwartende Toxinbelastung im Getreide zu treffen. Weitere Untersuchungen mit anderen Weizensorten, aber auch anderen befallenen Getreidearten an zahlreichen verschiedenen Umwelten über mehrere Jahre werden notwendig sein, um den betroffenen Anbauern und Abnehmern zuverlässige Empfehlungen zur Befallsminimierung und Prognosemodelle an die Hand geben zu können.

In Zukunft sollen auch weitere *Fusarium*-Toxine bei den Untersuchungen berücksichtigt werden. Ihre Wirkungen sind teilweise noch nicht ausreichend erforscht. Die EU hat mittlerweile auch für weitere *Fusarium*-Toxine, über deren Entwicklung in Pflanze bislang wenig bekannt ist, neue Grenzwerte festgelegt.

5 Anhang

5.1 Die Wetterdaten aus den Versuchsjahren 2004 und 2005 von beiden untersuchten Standorten

Abb. 28: Wetterdaten 2004 von Frankendorf und Osterseeon

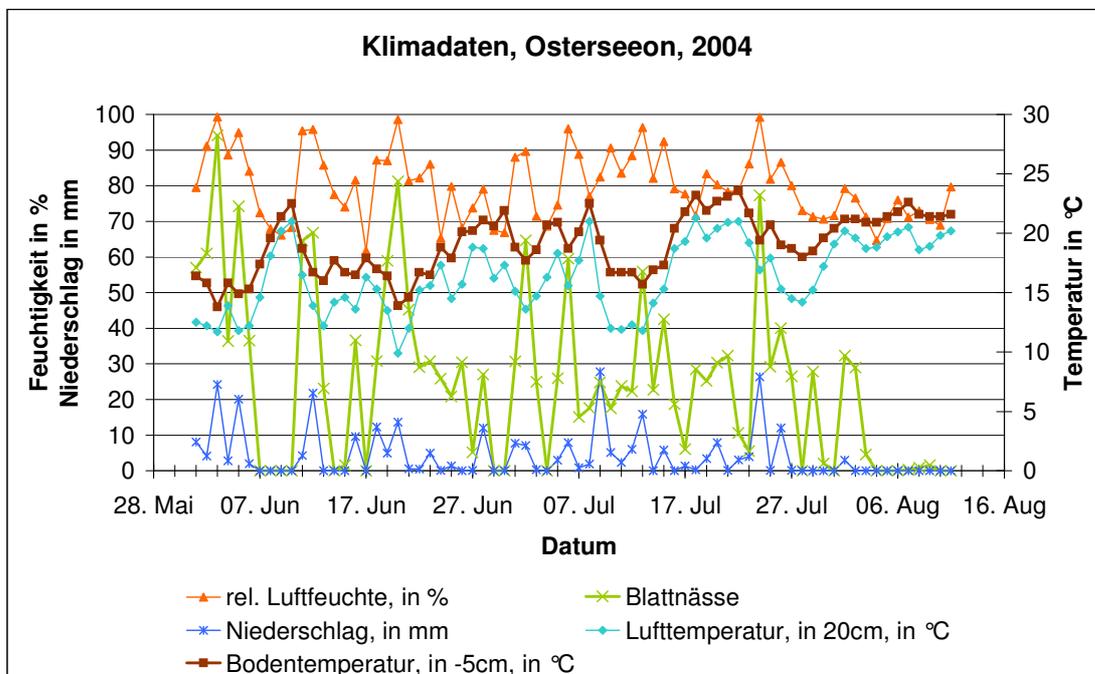
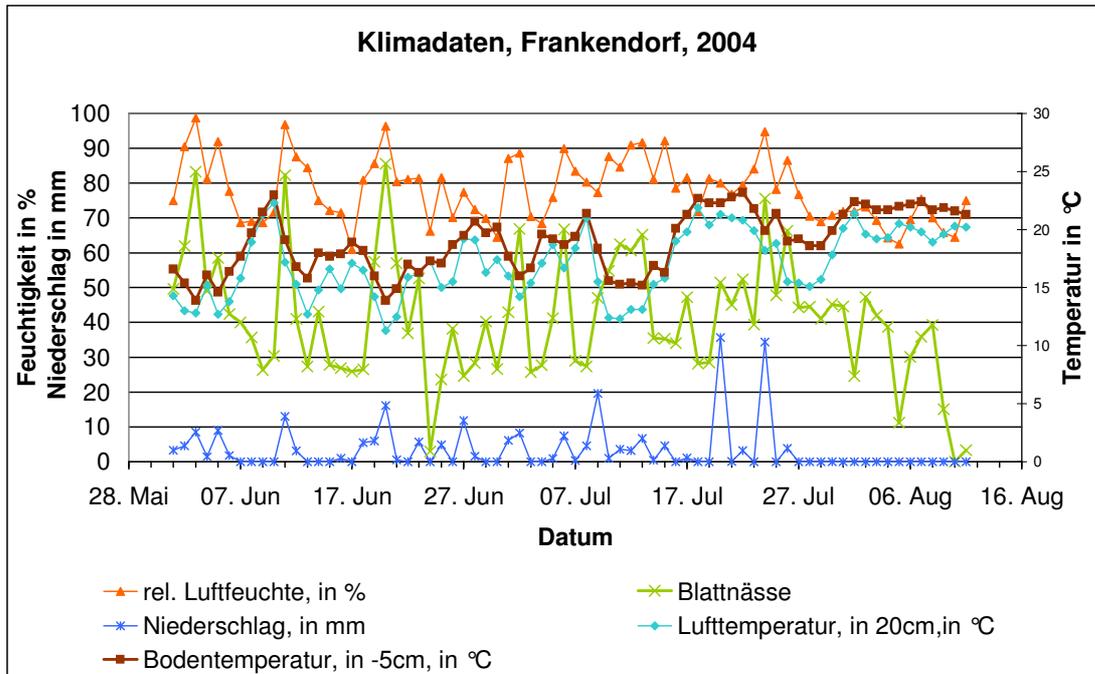
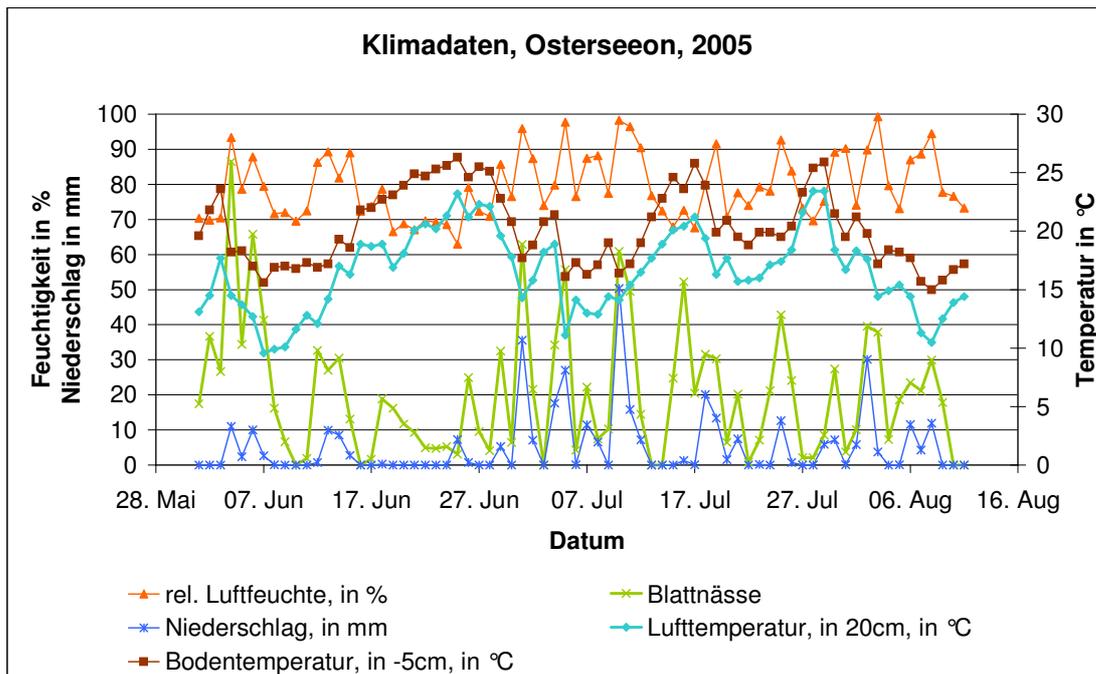
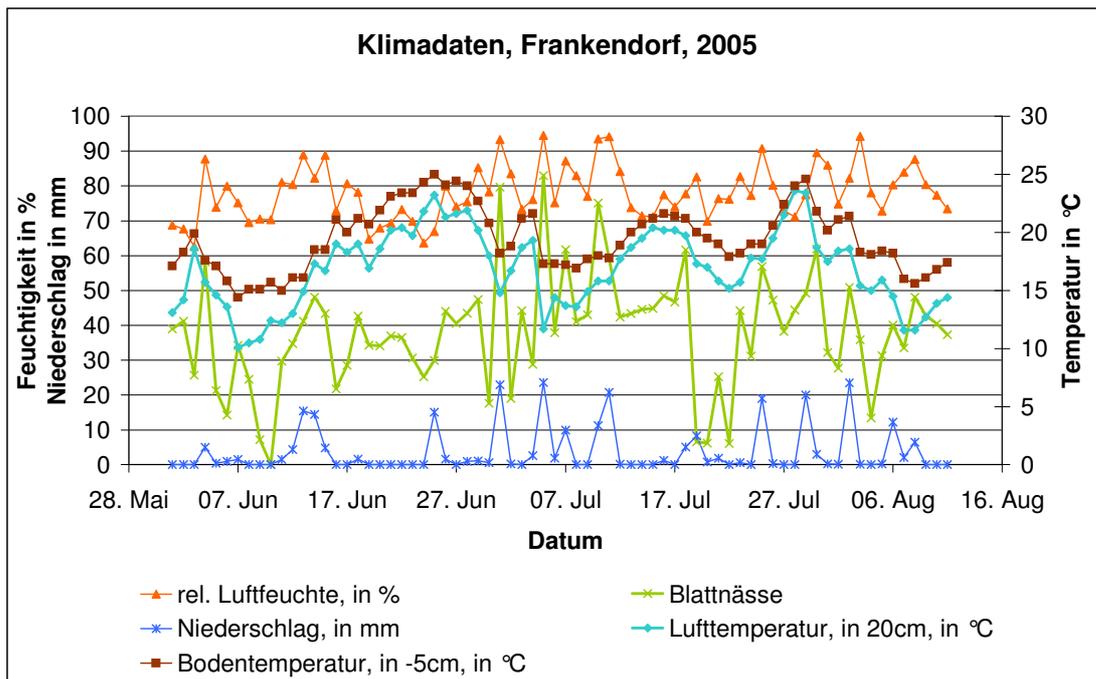


Abb. 29: Wetterdaten 2005 von Frankendorf und Osterseen



5.2 Entwicklungsstufen von Getreide

<http://www.bba.de/veroeff/bbch/bbchdeu.pdf>

Erweiterte BBCH-Skala, spezieller Teil

Getreide Witzemberger et al., 1989; Lancashire et al., 1991

BBCH-Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien von Getreide

(Weizen = *Triticum* sp. L., Gerste = *Hordeum vulgare* L.,
Hafer = *Avena sativa* L., Roggen = *Secale cereale* L.)

Code Beschreibung

Makrostadium 0: Keimung

- | | |
|----|--|
| 00 | Trockener Samen |
| 01 | Beginn der Samenquellung |
| 03 | Ende der Samenquellung |
| 05 | Keimwurzel aus dem Samen ausgetreten |
| 06 | Keimwurzel streckt sich, Wurzelhaare und/oder Seitenwurzeln sichtbar |
| 07 | Keimscheide (Koleoptile) aus dem Samen ausgetreten |
| 09 | Auflaufen: Keimscheide durchbricht Bodenoberfläche; Blatt an der Spitze der Koleoptile gerade sichtbar |

Makrostadium 1: Blattentwicklung

- | | |
|-----|---|
| 10 | Erstes Blatt aus der Koleoptile ausgetreten ^{1,2} |
| 11 | 1-Blatt-Stadium: 1. Laubblatt entfaltet, Spitze des 2. Blattes sichtbar |
| 12 | 2-Blatt-Stadium: 2. Laubblatt entfaltet, Spitze des 3. Blattes sichtbar |
| 13 | 3-Blatt-Stadium: 3. Laubblatt entfaltet, Spitze des 4. Blattes sichtbar |
| 1 . | Stadien fortlaufend bis ... |
| 19 | 9 und mehr Laubblätter entfaltet |

Makrostadium 2: Bestockung³

- | | |
|-----|---|
| 20 | Keine Bestockung |
| 21 | Erster Bestockungstrieb sichtbar: Beginn der Bestockung |
| 22 | 2 Bestockungstriebe sichtbar |
| 23 | 3 Bestockungstriebe sichtbar |
| 2 . | Stadien fortlaufend bis ... |
| 29 | Ende der Bestockung: Maximale Anzahl der Bestockungstriebe erreicht |

Makrostadium 3: Schossen (Haupttrieb)

- | | |
|-----|---|
| 30 | Beginn des Schosses: Haupttrieb und Bestockungstriebe stark aufgerichtet, beginnen sich zu strecken. Ährenspitzen mind. 1 cm vom Bestockungsknoten entfernt |
| 31 | 1-Knoten-Stadium: 1. Knoten dicht über der Bodenoberfläche wahrnehmbar, mind. 1 cm vom Bestockungsknoten entfernt |
| 32 | 2-Knoten-Stadium: 2. Knoten wahrnehmbar, mind. 2 cm vom 1. Knoten entfernt |
| 33 | 3-Knoten-Stadium: 3. Knoten mind. 2 cm vom 2. Knoten entfernt |
| 3 . | Stadien fortlaufend bis ... |
| 37 | Erscheinen des letzten Blattes (Fahnenblatt); letztes Blatt noch eingerollt |
| 39 | Ligula (Blatthäutchen)-Stadium: Blatthäutchen des Fahnenblattes gerade sichtbar, Fahnenblatt voll entwickelt |

Code	Beschreibung
Makrostadium 4: Ähren- / Rispenwellen	
41	Blattscheide des Fahnenblattes verlängert sich
43	Ähre/Rispe ist im Halm aufwärts geschoben. Blattscheide des Fahnenblattes beginnt anzuschwellen
45	Blattscheide des Fahnenblattes geschwollen
47	Blattscheide des Fahnenblattes öffnet sich
49	Grannenspitzen: Grannen werden über der Ligula des Fahnenblattes sichtbar
Makrostadium 5: Ähren- / Rispenchieben	
51	Beginn des Ähren-/Rispenchiebens: Die Spitze der Ähre/Rispe tritt heraus oder drängt seitlich aus der Blattscheide
52	20% der Ähre/Rispe ausgetreten
53	30% der Ähre/Rispe ausgetreten
54	40% der Ähre/Rispe ausgetreten
55	Mitte des Ähren-/Rispenchiebens: Basis noch in der Blattscheide
56	60% der Ähre/Rispe ausgetreten
57	70% der Ähre/Rispe ausgetreten
58	80% der Ähre/Rispe ausgetreten
59	Ende des Ähren-/Rispenchiebens: Ähre/Rispe vollständig sichtbar
Makrostadium 6: Blüte	
61	Beginn der Blüte: Erste Staubgefässe werden sichtbar
65	Mitte der Blüte: 50% reife Staubgefässe
69	Ende der Blüte
Makrostadium 7: Fruchtentwicklung	
71	Erste Körner haben die Hälfte ihrer endgültigen Grösse erreicht. Korninhalt wässrig
73	Frühe Milchreife
75	Mitte Milchreife: Alle Körner haben ihre endgültige Grösse erreicht. Korninhalt milchig, Körner noch grün
77	Späte Milchreife
Makrostadium 8: Frucht- und Samenreife	
83	Frühe Teigreife
85	Teigreife: Korninhalt noch weich aber trocken. Fingernageleindruck reversibel
87	Gelbreife: Fingernageleindruck irreversibel
89	Vollreife: Korn ist hart, kann nur schwer mit dem Daumennagel gebrochen werden
Makrostadium 9: Absterben	
92	Totreife: Korn kann nicht mehr mit dem Daumennagel eingedrückt bzw. nicht mehr gebrochen werden
93	Körner lockern sich tagsüber
97	Pflanze abgestorben, Halme brechen zusammen
99	Erntegut

¹ Ein Blatt gilt als entfaltet, wenn seine Ligula oder die Spitze des nächsten Blattes sichtbar ist

² Bestockung kann ab Stadium 13 erfolgen; in diesem Fall ist auf Stadium 21 überzugehen

³ Das Schossen kann schon vor Ende der Bestockung einsetzen; in diesem Fall ist auf Stadium 30 überzugehen

5.3 Gegenüberstellung der Probennahmetermine, der Entwicklungsstufe und der Art der Probe aus 2004 und 2005

Tab. 15: Übersicht über den Termin der Probennahme, das jeweilige Entwicklungsstadium und die Probenart für Frankendorf und Osterseeon 2004

Complet und Petrus in Frankendorf und Osterseeon 2004			
Datum der Probennahme	BBCH	Blattproben	Ährenproben
11.05.04	32	x	
14.05.04	32	x	
18.05.04	33	x	
21.05.04	35	x	
25.05.04	37	x	
28.05.04	39	x	
01.06.04	43	x	
04.06.04	45	x	
08.06.04	49	x	
11.06.04	58	x	
15.06.04	61	x	
18.06.04	65	x	
22.06.04	67	x	x
25.06.04	70	x	x
29.06.04	71	x	x
02.07.04	72	x	x
06.07.04	73		x
09.07.04	75		x
13.07.04	76		x
16.07.04	77		x
20.07.04	78		x
23.07.04	80		x
27.07.04	83		x
30.07.04	85		x
03.08.04	87		x
06.08.04	90		x
10.08.04	92		x
	100		x

Tab. 16: Übersicht über den Termin der Probennahme, das jeweilige Entwicklungsstadium und die Probenart für Frankendorf und Osterseeon 2005

Complet und Petrus in Frankendorf und Osterseeon 2005					
Datum der Probennahme	BBCH		Blattproben		Ährenproben
	Frankendorf	Osterseeon	Frankendorf	Osterseeon	
10.05.05	31		x		
13.05.05	32		x		
17.05.05	33	32	x	x	
20.05.05	34	33	x	x	
24.05.05	35	34	x	x	
27.05.05	37	35	x	x	
31.05.05	40	37	x	x	
03.06.05	43	43	x	x	
07.06.05	46	46	x	x	
10.06.05	50	50	x	x	
14.06.05	55	55	x	x	x
17.06.05	60	60	x	x	x
21.06.05	65	65	x	x	x
24.06.05	70	70	x	x	x
29.06.05	73	73	x	x	x
01.07.05	74	74		x	x
05.07.05	75				x
08.07.05	77				x
12.07.05	79				x
15.07.05	80				x
19.07.05	82				x
22.07.05	83				x
26.07.05	85				x
29.07.05	86				x
02.08.05	88				x
05.08.05	90				x
09.08.05	95				x
19.08.05	100				x

5.4 Korrelationen der zeitlichen Verläufe *F. graminearum*-DNA und Trichotheceproduzenten-DNA

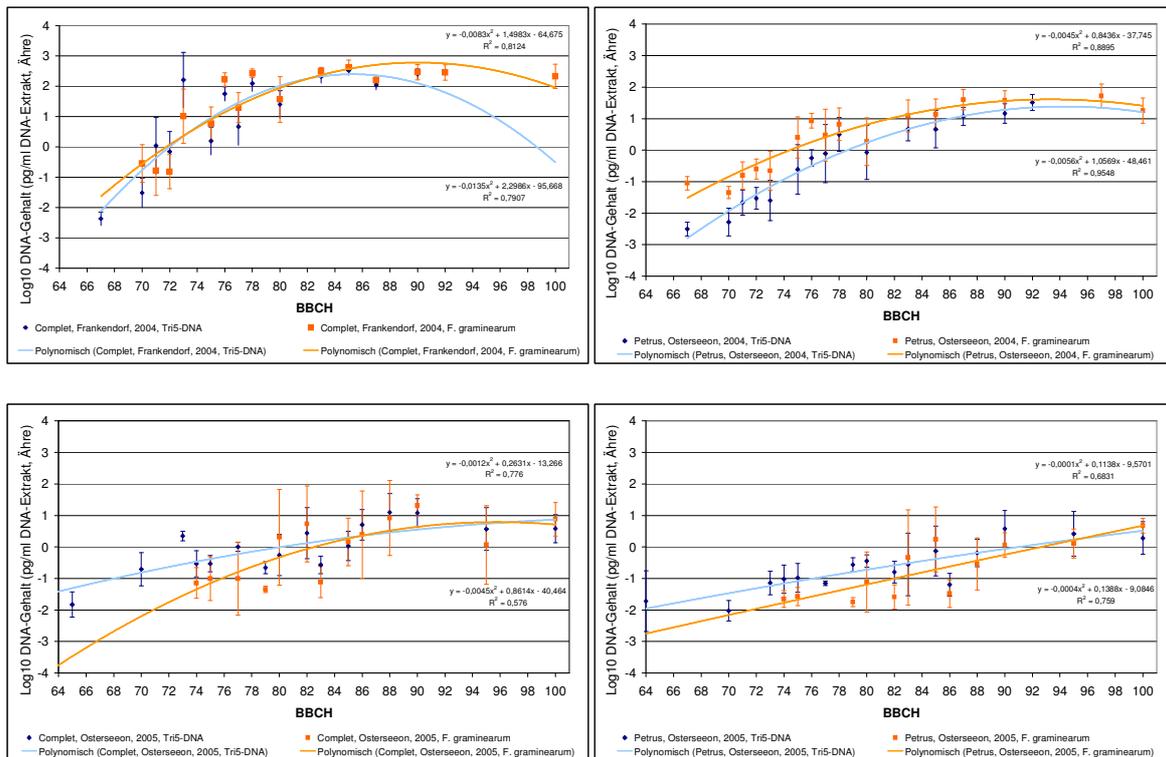


Abb. 30: Zeitliche Verläufe von Trichotheceproduzenten-DNA und *F. graminearum*-DNA in Weizen.

In der oberen Reihe sind zwei Beispiele aus 2004 am Standort Frankendorf (links in der Sorte `Complet`) und Osterseeon (rechts in `Petrus`) abgebildet. In der unteren Reihe sind zwei Beispiele aus 2005 am Standort Osterseeon (links in der Sorte `Complet` und rechts in der Sorte `Petrus`) dargestellt. Aufgetragen sind jeweils die logarithmierten DNA-Mittelwerte zur Entwicklungsstufe (BBCH), die Standardabweichungen und die jeweilige Trendlinie mit entsprechender Gleichung und Bestimmtheitsmaß (R^2).

5.5 Zeitliche Zusammenhänge von DON-Gehalt, DNA-Gehalt von Trichothecebildnern und *tri5*-Genexpression

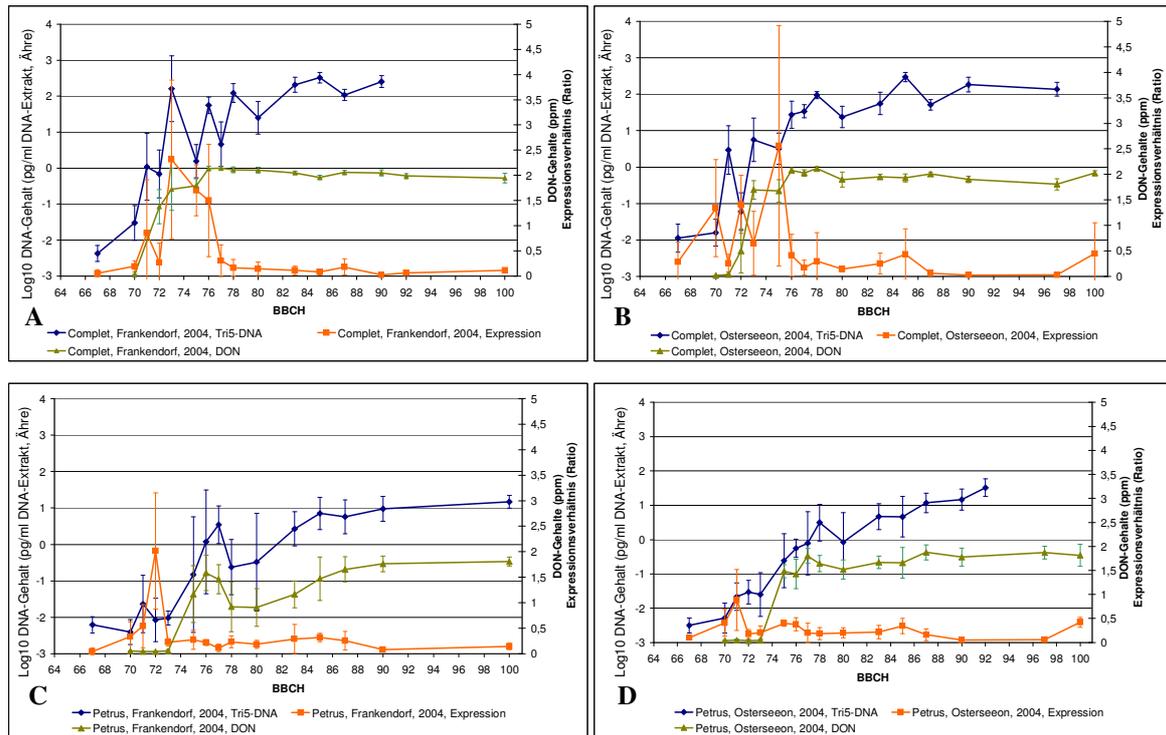


Abb. 31: Zeitliche Verläufe von DON-Gehalt, DNA-Gehalt von Trichothecebildnern und *tri5*-Genexpression bei 'Compleat' und 'Petrus' in Frankendorf und Osterseeon im Jahr 2004.

Zur optisch übersichtlicheren Darstellung sind die einzelnen Messwerte einer Reihe verbunden dargestellt, obwohl keine Aussage über den Verlauf zwischen den Messpunkten getätigt werden kann.

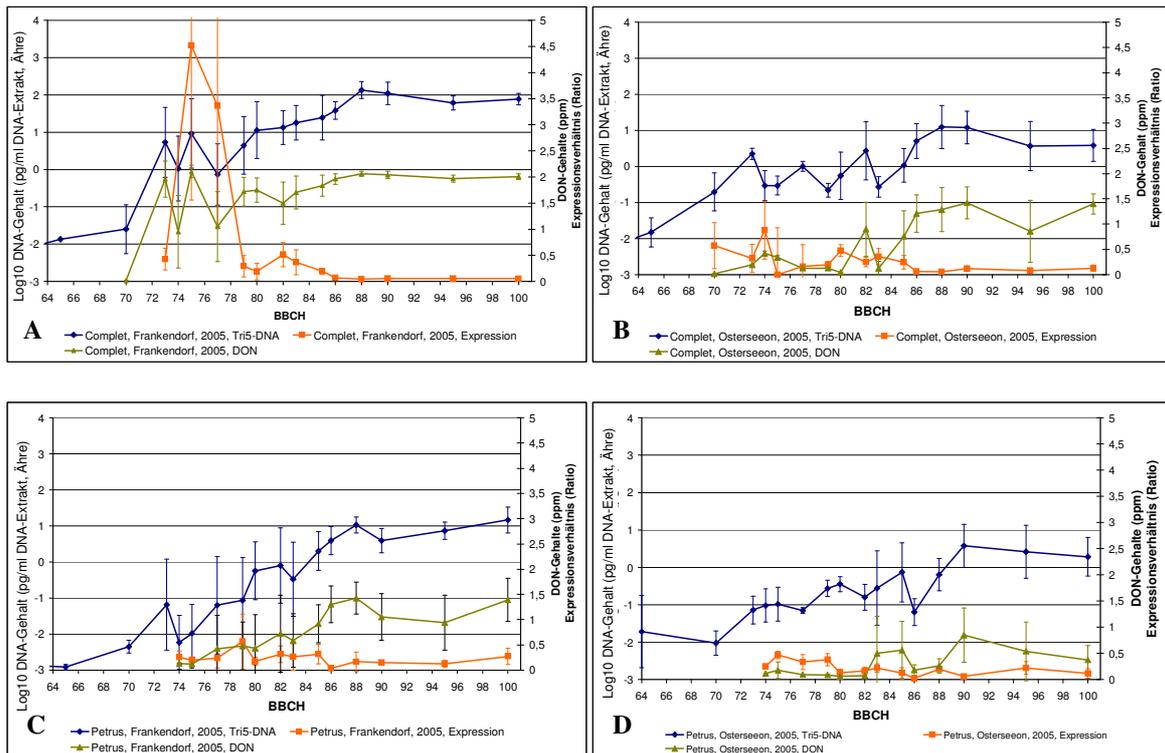


Abb. 32: Zeitliche Verläufe von DON-Gehalt, DNA-Gehalt von Trichothecebildnern und *tri5*-Genexpression bei 'Complet' und 'Petrus' in Frankendorf und Osterseeon im Jahr 2005.

Zur optisch übersichtlicheren Darstellung sind die einzelnen Messwerte einer Reihe verbunden dargestellt, obwohl keine Aussage über den Verlauf zwischen den Messpunkten getätigt werden kann

5.6 Grafische Darstellungen der Tukey-Kramer-Tests

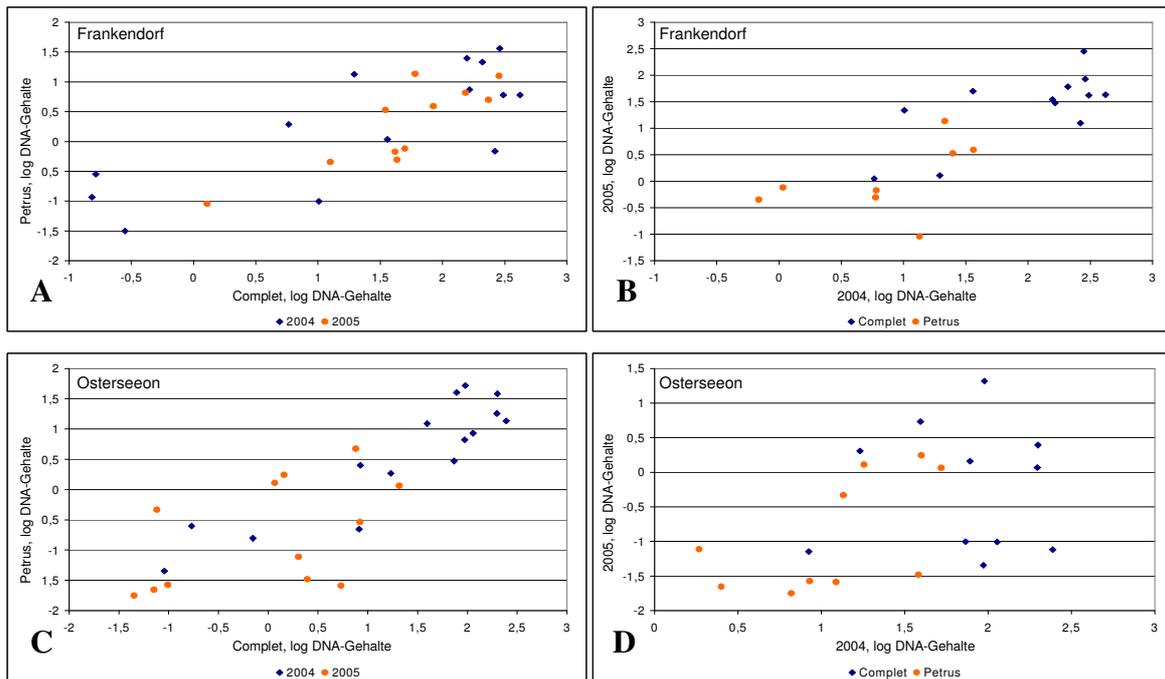


Abb. 33: Grafische Darstellung des Tukey-Kramer-Tests für die Einflussfaktoren beim Standort.

Dargestellt sind die logarithmierten Messwerte aus den Untersuchungen des Weizens auf *F. graminearum*-DNA. A- Einfluss des Anbaujahres auf die *Fusarium*-Entwicklung am Standort Frankendorf, B- Einfluss der Sorten auf die *Fusarium*-Entwicklung in Frankendorf, C- Einfluss des Anbaujahres auf die *Fusarium*-Entwicklung am Standort Osterseeon, D- Einfluss der Sorten auf die *Fusarium*-Entwicklung in Osterseeon.

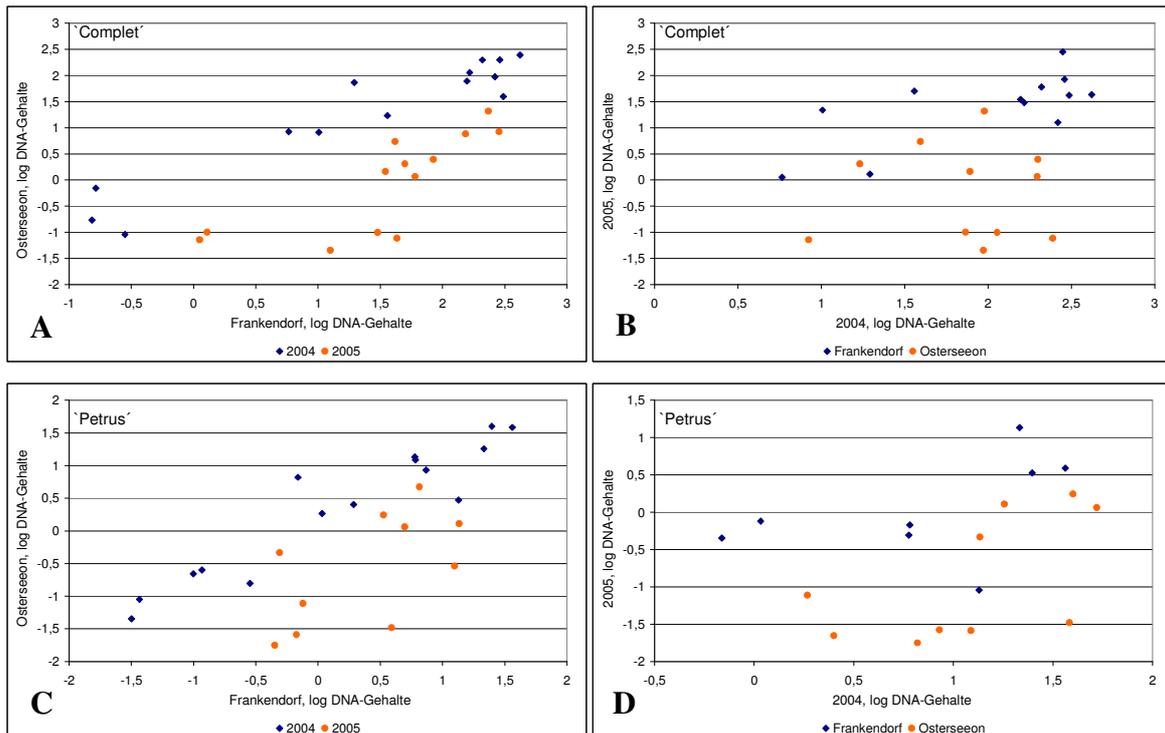


Abb. 34: Grafische Darstellung des Tukey-Kramer-Tests für die Einflussfaktoren beim Befall der Weizen-Sorten.

Dargestellt sind die logarithmierten Messwerte aus den Untersuchungen des Weizens auf *F. graminearum*-DNA. A- Einfluss des Anbaujahres auf die *Fusarium*-Entwicklung in der Weizen-Sorte 'Complet', B- Einfluss der Standorte auf die *Fusarium*-Entwicklung in der Sorte 'Complet', C- Einfluss des Anbaujahres auf die *Fusarium*-Entwicklung in der Weizen-Sorte 'Petrus', D- Einfluss der Standorte auf die *Fusarium*-Entwicklung in der Sorte 'Petrus'.

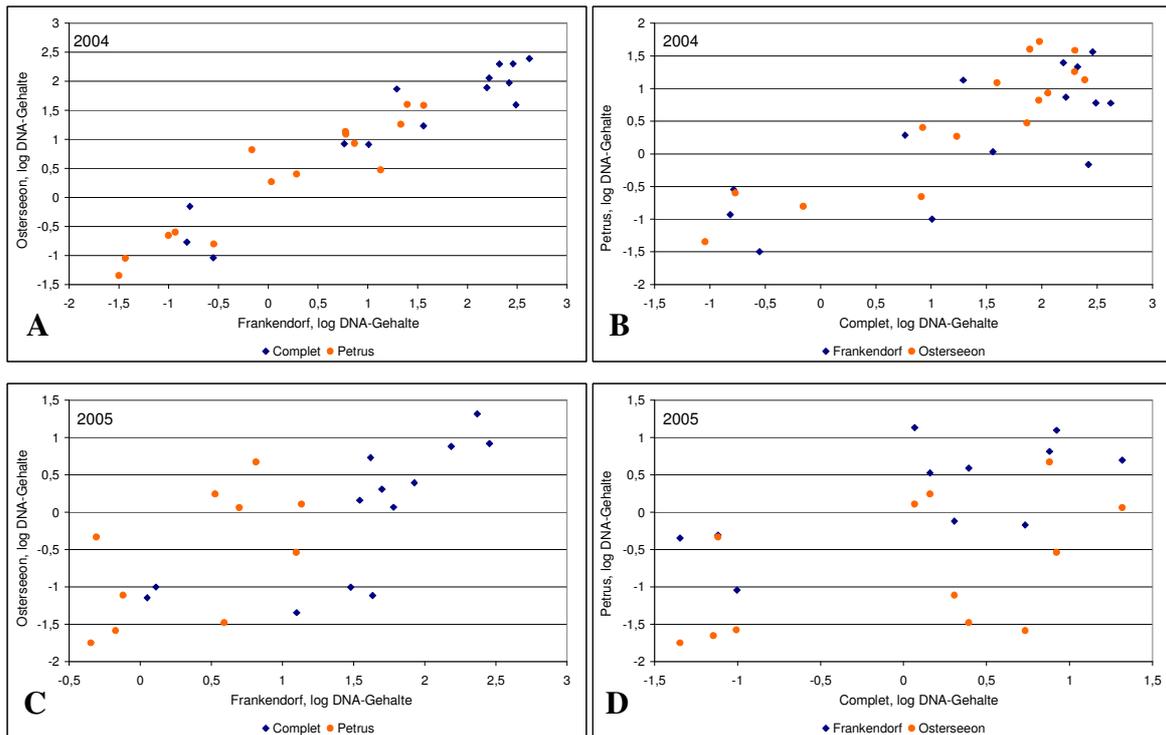


Abb. 35: Grafische Darstellung des Tukey-Kramer-Tests für die Einflussfaktoren in den beiden Anbaujahren.

Dargestellt sind die logarithmierten Messwerte aus den Untersuchungen des Weizens auf *F. graminearum*-DNA. A- Einfluss der Weizen-Sorte auf die *Fusarium*-Entwicklung im Anbaujahr 2004, B- Einfluss der Standorte auf die *Fusarium*-Entwicklung im Versuchsjahr 2004, C- Einfluss der Weizen-Sorte auf die *Fusarium*-Entwicklung im Jahr 2005, D- Einfluss der Standorte auf die *Fusarium*-Entwicklung im Jahr 2005.

Literaturverzeichnis

- ADOLF, B. (1998): Epidemiologie und Nachweis von Getreidefusariosen: Untersuchungen an Weizen und Gerste. Doktorarbeit, TU München, Herbert Utz Verlag.
- ALMEIDA, A.; THIERY, J.P.; MAGDELENAT, H.; RADVANYI, F. (2004): Gene expression analysis by real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of tissue handling. *Analytical Biochemistry*, 328, 101-108.
- ANONYMUS (2005): Relative Quantification Getting Started Guide. Applied Biosystems, Foster City, USA.
- BAKAN, B.; GIRAUD-DELVILLE, C.; PINSON, L.; RICHARD-MOLARD, D.; FOURNIER, E.; BRYGOO, Y. (2002): Identification by PCR of *Fusarium culmorum* Strains Producing Large and Small Amounts of Deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5472 - 5479.
- BARTELS, G.; RODEMANN, B. (2003): Strategien zur Vermeidung von Mykotoxinen im Getreide. *Gesunde Pflanze*, 55, 125-135.
- BENITO, E.P.; TEN HAVE, A.; VAN 'T KLOOSTER, J.W.; VAN KAN, J.A.L. (1998): Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 207-220.
- BEYER, M.; RÖDING, S.; LUDEWIG, A.; VERREET, J.-A. (2004): Germination and Survival of *Fusarium graminearum* Macroconidia as Affected by Environmental Factors. *Journal of Phytopathology*, 152, 92-97.
- BEYER, M.; VERREET, J.-A. (2005): Germination of *Gibberella zeae* ascospores as affected by age of spores after discharge and environmental factors. *European Journal of Plant Pathology*, 111, 381-389.
- BIRZELE, B.; MEIER, A.; HINDORF, H.; KRÄMER, J.; DEHNE, H.-W. (2002): Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 667-673.
- BRANDFASS, CH.; KARLOVSKY, P. (2006): Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. *BMC Microbiology*, 6.
- BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A.; ELANDER, R.P. (Hrsg.) (1998): Applications of PCR in Mycology. CAB International, Oxford UK.
- BUHR, T.L.; DICKMAN, M.B. (1994): Isolation, Characterization, and Expression of a Second beta-Tubulin-Encoding Gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4155-4159.

- BUHR, T.L.; DICKMAN, M.B. (1997): Gene Expression Analysis during Conidial Germ Tube and Appressorium Development in *Colletotrichum trifolii*. Applied and Environmental Microbiology, 63, 2378-2383.
- BURTON, R.A.; ZHANG, X.-Q.; HRMOVA, M.; FINCHER, G.B. (1999): A single Limit Dextrinase Gene Is Expressed Both in the Developing Endosperm and in Germinated Grains of Barley. Plant Physiology, 119, 859-871.
- BUSTIN, S.A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169-193.
- BUSTIN, S.A. (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of Molecular Endocrinology, 29, 23-39.
- BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. (2004): Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. Journal of Biomolecular Techniques, 15, 155-166.
- BÜTTNER, P. (2006): Das Artenspektrum der Gattung *Fusarium* an Weizen und Roggen in Bayern in den Jahren 2003 und 2004. Gesunde Pflanze, 58, 28-33.
- CHALA, A.; WEINERT, J.; WOLF, G.A. (2003): An Integrated Approach to the Evaluation of the Efficacy of Fungicides Against *Fusarium culmorum*, the Cause of Head Blight of Wheat. Journal of Phytopathology, 151, 673-678.
- CHELKOWSKI, J. (Hrsg.) (1991): Cereal Grain Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Elsevier, Amsterdam NL.
- CHOO, T.M.; MARTIN, R.A.; HO, K.M.; SHEN, Q.; FEDAK, G.; SAVARD, M.; VOLDENG, H.; FALK, D.E.; ETIENNE, M.; SPARRY, E. (2004): *Fusarium* Head Blight and Deoxynivalenol Accumulation of Barley in Eastern Canada: Cultivar Response and Correlation Analysis. Plant Disease, 88, 837-844.
- CLEVELAND, T.E.; DOWD, P.F.; DESJARDINS, A.E.; BHATNAGAR, D.; COTTY, P.J. (2003): United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. Pest Management Science, 59, 629-642.
- CUMAGUN, C.J.R.; MIEDANER, T. (2003): Aggressiveness of 42 isolates of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) in wheat under field and greenhouse conditions. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 110, 554-559.
- CUMAGUN, C.J.R.; MIEDANER, T. (2004): Segregation for aggressiveness and deoxynivalenol production of a population of *Gibberella zeae* causing head blight of wheat. European Journal of Plant Pathology, 110, 789-799.
- CUMAGUN, C.J.R.; RABENSTEIN, F.; MIEDANER, T. (2004): Genetic variation and covariation for aggressiveness, deoxynivalenol production and fungal colonization among progeny of *Gibberella zeae* in wheat. Plant Pathology, 53, 446-453.

- DE WOLF, E.D.; MADDEN, L.V.; LIPPS, P.E. (2003): Risk Assessment Models for Wheat *Fusarium* Head Blight Epidemics Based on Within-Season Weather Data. *Phytopathology*, 93, 428-435.
- DELWICHE, S.R.; PEARSON, T.C.; BRABEC, D.L. (2005): High-Speed Optical Sorting of Soft Wheat for Reducing of Deoxynivalenol. *Plant Disease*, 89, 1214-1219.
- DESJARDINS, A.E. (2003): *Gibberella* from A (*venaceum*) To Z (*aeae*). *Annual Review of Phytopathology*, 41, 177-198.
- DESJARDINS, A.E.; HOHN, T.M.; MCCORMICK, S.P. (1993): Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium* Species: Chemistry, Genetics, and Significance. *Microbiological Reviews*, 57, 595-604.
- DIAZ, D. E. (Hrsg.) (2005): *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham.
- DONALDSON, G.C.; BALL, L.A.; AXELROOD, P.E.; GLASS, N.L. (1995): Primer Sets Developed To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes Are Useful in Differentiating *Fusarium* Species Associated with Conifers. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1331-1340.
- DOOHAN, F.M.; WESTON, G.; REZANOOR, H.N.; PARRY, D.W.; NICHOLSON, P. (1999): Development and Use of Reverse Transcription-PCR Assay To Study Expression of *tri5* by *Fusarium* Species In Vitro and In Planta. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3850-3854.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. (1990): Isolation of Plant DNA From Fresh Tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- EDWARDS, S.G.; PIRGOZLIEV, S.R.; HARE, M.C.; JENKINSON, P. (2001): Quantification of Trichothecene-Producing *Fusarium* Species in Harvested Grain by Competitive PCR To Determine Efficacies of Fungicides against *Fusarium* Head Blight of Winter Wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1575-1580.
- EIBLMEIER, P.; LEPSCHY VON GLEISSENTHALL, J. (2007): Risk evaluation of deoxynivalenol levels in Bavarian wheat from survey data. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 114, 69-75.
- ELLNER, F.; SCHUSTER, R. (2006): Untersuchungen zum Blühvorgang des Weizens und dessen Einfluss auf *Fusarium*-Infektion und Mykotoxinbildung. *BBA-Mitteilungen*, 55. Deutsche Pflanzenschutztagung, 65.
- ENGLE, J.S.; LIPPS, P.E.; GRAHAM, T.L.; BOEHM, M.J. (2004): Effects of Choline, Betaine, and Wheat Floral Extracts on Growth of *Fusarium graminearum*. *Plant Disease*, 88, 175-180.
- EUDES, F.; COMEAU, A.; RIOUX, S.; COLLIN, J. (2001): Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight (*Fusarium graminearum*) development in spring wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23, 318-322.

- FAUZI, M.T.; PAULITZ, T.C. (1994): The Effect of Plant Growth Regulators and Nitrogen on *Fusarium* Head Blight of the Spring Wheat Cultivar Max. *Plant Disease*, 78, 289-292.
- FERNANDEZ, M.R.; CHEN, Y. (2005): Pathogenicity of *Fusarium* Species on Different Plant Parts of Spring Wheat Under Controlled Conditions. *Plant Disease*, 89, 164-169.
- FERNANDO, W.G.D.; PAULITZ, T.C.; SEAMAN, W.L.; DUTILLEUL, P.; MILLER, J.D. (1997): Head Blight Gradients Caused by *Gibberella zeae* from Area Sources of Inoculum in Wheat Field Plots. *Phytopathology*, 87, 414-421.
- FERNANDO, W.G.D.; MILLER, J.D.; SEAMAN, W.L.; SEIFERT, K.; PAULITZ, T.C. (2000): Daily and seasonal dynamics of airborne spores of *Fusarium graminearum* and other *Fusarium* species sampled over wheat plots. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 78, 497-505.
- FLAHERTY, J.E.; PIRTTILÄ, A.M.; BLUHM, B.H.; WOLOSHUK, C.P. (2003): *PAC1*, a pH-Regulatory Gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5222-5227.
- FORSBERG, G.; JOHNSON, L.; LAGERHOLM, J. (2005): Effects of aerated steam seed treatment on cereal seed-borne diseases and crop yield. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 112, 247-256.
- FÖRSCHLER, A. (2004): *Fusarium*- Workshop in Feldkirchen. *GetreideMagazin*, 9, 186.
- GOSMAN, N.; CHANDLER, E.; THOMSETT, M.; DRAEGER, R.; NICHOLSON, P. (2005): Analysis of the relationship between parameters of resistance to *Fusarium* head blight and in vitro tolerance to deoxynivalenol of the winter wheat cultivar WEK0609. *European Journal of Plant Pathology*, 111, 57-66.
- GOSWAMI, R.S.; XU, J.-R.; TRAIL, F.; HILBURN, K.; KISTLER, H.C. (2006): Genomic analysis of host-pathogen interaction between *Fusarium graminearum* and wheat during early stages of disease development. *Microbiology*, 152, 1877-1890.
- HAGN, A.; PRITSCH, K.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J. C. (2003): Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp.. *Biology and Fertility of Soils*, 38, 236-244.
- HESTBERG, H.; FELDING, G.; ELMHOLT, S. (2002): *Fusarium culmorum* Infection of Barley Seedlings: Correlation between Aggressiveness and Deoxynivalenol Content. *Journal of Phytopathology*, 150, 308-312.
- HÖHN, D.; ROSENBERGER, A.; KAUL, H.-P.; KÜBLER, E.; AUFHAMMER, W. (2002): Ährenfusariumbefall (*F. culmorum*) und Deoxynivalenol-Akkumulation im Kornausbildungsverlauf abreifedifferenzierter Winterweizenbestände. *Pflanzenbauwissenschaften*, 6, 1-8.

- HOPE, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. (2005): Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. Letters in Applied Microbiology, 40, 295-300.
- HOPE, R.; MAGAN, N. (2003): Two-dimensional environmental profiles of growth, deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* on a wheat-based substrate. Letters in Applied Microbiology, 37, 70-74.
- HUGUETTE, L.; LAVIE, J.; LACOLLEY, P.; DARET, D.; BONNET, J.; LAMARZIERE, J.-M. D. (2000): Freeze-drying Allows Double Nonradioactive ISH and Antigenic Labeling. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 48, 499-507.
- ICHINOE, M.; KURATA, H.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. (1983): Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with Special Reference to Production of Trichothecenes and Zearalenone. Applied and Environmental Microbiology, 46, 1364-1369.
- INCH, S. A.; GILBERT, J. (2003 a): Survival of *Gibberella zeae* in *Fusarium*- Damaged Wheat Kernels. Plant Disease, 87, 282-287.
- INCH, S.; GILBERT, J. (2003 b): The incidence of *Fusarium* species recovered from inflorescences of wild grasses in southern Manitoba. Canadian Journal of Plant Pathology, 25, 379-383.
- JOFFE, A. Z. (1986): *Fusarium* Species Their Biology and Toxicology. John Wiley and Sons, New York.
- KANG, Z.; ZINGEN-SELL, I.; BUCHENAUER, H. (2005): Infection of wheat spikes by *Fusarium avenaceum* and alterations of cell wall components in the infected tissue. European Journal of Plant Pathology, 111, 19-28.
- KANG, Z.; HUANG, L.; BUCHENAUER, H. (2004): Ultrastructural and cytochemical studies on infection of wheat spikes by *Microdochium nivale*. Journal of Plant Diseases and Protection, 111, 351-361.
- KIM, H.-S.; LEE, T.; DAWLATANA, M.; YUN, S.-H.; LEE, Y.-W. (2003): Polymorphism of trichothecene biosynthesis genes in deoxynivalenol- and nivalenol-producing *Fusarium graminearum* isolates. Mycological Research, 107, 190-197.
- KOCH, E.; WEIL, B.; WÄCHTER, R.; WOHLLEBEN, S.; SPIESS, H.; KRAUTHAUSEN, H.-J. (2006): Evaluation of selected microbial strains and commercial alternative products as seed treatments for the control of *Tilletia tritici*, *Fusarium culmorum*, *Drechslera graminea* and *D. teres*. Journal of Plant Diseases and Protection, 113, 150-158.
- KONIETZNY, U.; GREINER, R. (2003): The Application of PCR in the Detection of Mycotoxigenic Fungi in Foods. Brazilian Journal of Microbiology, 34, 283-300.
- KÜBLER, E. (1994): Weizenanbau. Ulmer, Stuttgart.

- LANGEVIN, F.; EUDES, F.; COMEAU, A. (2004): Effect of trichothecens produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 735-746.
- LEE, T.; HAN, Y.-K.; KIM, K.-H.; YUN, S.-H.; LEE, Y.-W. (2002): *Tri13* and *Tri7* Determine Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing Chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2148-2154.
- LEPSCHY VON GLEISSENTHAL, J.; GENSLER, H. (2001): Verteilung von Deoxynivalenol in Einzelkörnern verschiedener Fraktionen von Weizen. *Bodenkultur und Pflanzenbau*, 5, 203-208.
- LOTTSPEICH, F.; ZORBAS, H. (Hrsg.) (1998): *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- LOVELL, D.J.; PARKER, S.R.; VAN PETEGHEM, P.; WEBB, D.A.; WELHAM, S.J. (2002): Quantification of Raindrop Kinetic Energy for Improved Prediction of Splash-Dispersed Pathogens. *Phytopathology*, 92, 497-503.
- LUDEWIG, A.; KABSCH, U.; VERREET, J.-A. (2005a): Mycotoxin production of 31 *Fusarium graminearum* isolates and aggressiveness against wheat seedlings. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 112, 124-133.
- LUDEWIG, A.; KABSCH, U.; VERREET, J.-A. (2005b): Comparative deoxynivalenol accumulation and aggressiveness of isolates of *Fusarium graminearum* on wheat and the influence on yield as affected by fungal isolate and wheat cultivar. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 112, 329-342.
- MAGAN, N.; HOPE, R.; COLLEATE, A.; BAXTER, E.S. (2002): Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 685-690.
- MARKELL, S.G.; FRANCL, L.J. (2003): *Fusarium* Head Blight: Species Prevalence and *Gibberella zeae* Spore Type. *Plant Disease*, 87, 814-820.
- MAYER, Z.; FÄRBER, P.; GEISEN, R. (2003): Monitoring the Production of Aflatoxin B1 in Wheat by Measuring the Concentration of *nor-1* mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1154-1158.
- MCCARTNEY, H.A.; FOSTER, S.J.; FRAAIJE, B.A., WARD, E. (2003): Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*, 59, 129-142.
- MCMAUGH, S.J.; LYON, B.R. (2003): Real-Time Quantitative RT-PCR Assay of Gene Expression in Plant Roots during Fungal Pathogenesis. *BioTechniques*, 34, 982-986.
- MEIER, U. (2001): *Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen*, BBCH Monografie. Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, Braunschweig.

- MENNITI, A.M.; PANCALDI, D.; MACCAFERRI, M.; CASALINI, L. (2003): Effect of fungicides on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in durum wheat grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 109-115.
- MESTERHAZY, A.; BARTOK, T.; MIROCHA, G.C.; KOMOROCZY, R. (1999): Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding* 118, 97-110.
- MESTERHAZY, A.; BARTOK, T.; LAMPER, C. (2003): Influence of Wheat Cultivar, Species of *Fusarium*, and Isolate Aggressiveness on the Efficacy of Fungicides for Control of *Fusarium* Head Blight. *Plant Disease*, 87, 1107- 1115.
- MIEDANER, T.; REINBRECHT, C. (2001): Trichothecene Content of Rye and Wheat Genotypes Inoculated with a Deoxynivalenol- and a Nivalenol-producing Isolate of *Fusarium culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 149, 245-251.
- MILLER, J.D.; APSIMON, J.W.; BLACKWELL, B.A.; GREENHALGH, R.; TAYLOR, A. (2002): Deoxynivalenol: a 25 Year perspective on a trichothecene of agricultural importance. In Summerell, B.A.; Leslie, J.F.; Backhouse, D.; Bryden, W.L.; Burgess, L.W. (Hrsg.): *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul Minnesota USA, 310-320.
- MILLER, J.D.; EWEN, M.A. (1997): Toxic Effects of Deoxynivalenol on Ribosomes and Tissues of the Spring Wheat Cultivars Frontana and Casavant. *Natural Toxins*, 5, 234-237.
- MUMFORD, R.; BOONHAM, N.; TOMLINSON, J.; BARKER, I. (2006): Advances in molecular phytodiagnostics- new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology*, 116, 1-19.
- NEWTON, C.R.; GRAHAM, A. (1994): PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- NICHOLSON, P.; SIMPSON, D.R.; WILSON, A.H.; CHANDLER, E.; THOMSETT, M. (2004): Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 503-514.
- NICHOLSON, P.; SIMPSON, D.R.; WESTON, G.; REZANOOR, H.N.; LEES, A.K.; PARRY, D.W.; JOYCE, D. (1998): Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53, 17-37.
- NICOLAISEN, M.; JUSTESEN, A.F.; THRANE, U.; SKOUBOE, P.; HOLMSTROM, K. (2005): An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecene producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *Journal of Microbiological Methods*, 62, 57-69.
- NIESSEN, M.L.; VOGEL, R.F. (1997): Specific Identification of *Fusarium graminearum* by PCR with *gaoA* Targeted Primers. *Systematic and Applied Microbiology*, 20, 111-123.

- OBST, A.; BECHTEL, A. (2000): Witterungsvoraussetzungen für den Ährenbefall des Weizens mit *Fusarium graminearum*. Schriftenreihe der LBP, 4, 81-88.
- OBST, A.; GEHRING, K. (Hrsg.) (2002): Getreide Pilzkrankheiten. Thomas Mann Verlag, Gelsenkirchen.
- PARRY, D.W.; JENKINSON, P.; MCLEOD, L. (1995): *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals. Plant Pathology, 44, 207-238.
- PARRY, D.W.; NICHOLSON, P. (1996): Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. Plant Pathology, 45, 383-391.
- PAUL, P.A.; EL-ALLAF, S.M.; LIPPS, P.E.; MADDEN, L.V. (2004): Rain Splash Dispersal of *Gibberella zeae* Within Wheat Canopies in Ohio. Phytopathology, 94, 1342-1349.
- PEPLOW, A.W.; TAG, A.G.; GARIFULLINA, G.F.; BEREMAND, M.N. (2003): Identification of New Genes Positively Regulated by *Tri 10* and a Regulatory Network for Trichothecene Mycotoxin Production. Applied and Environmental Microbiology, 69, 2731-2736.
- PEREYRA, S.A.; DILL-MACKY, R.; SIMS, A.L. (2004): Survival and Inoculum Production of *Gibberella zeae* in Wheat Residue. Plant Disease, 88, 724-730.
- PFAFFL, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, 29, 6.
- PFAFFL, M.W. (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. Biospektrum, 10, 92-95.
- PIRGOLZLIEV, S.R.; EDWARDS, S.G.; HARE, M.C.; JENKINSON, P. (2002): Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of *Fusarium* head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. European Journal of Plant Pathology, 108, 469-478.
- PRECHT, M.; KRAFT, R. (1993): Bio-Statistik 2. Oldenbourg Verlag, München.
- PROCTOR, R.H.; HOHN, T.M.; MCCORMICK, S.P.; DESJARDINS, A.E. (1995): *Tri6* Encodes an Unusual Zinc Finger Protein Involved in Regulation of Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1923-1930.
- PROM, L.K.; HORSLEY, R.D.; STEFFENSON, B.J.; SCHWARZ, P.B. (1999): Development of *Fusarium* Head Blight and Accumulation of Deoxynivalenol in Barley Sampled at Different Growth Stages. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 57, 60-63.

- REISCHER, G.H.; LEMMENS, M.; FARNLEITNER, A.; ADLER, A.; MACH, R.L. (2004): Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe. *Journal of Microbiological Methods*, 59, 141-146.
- ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F.M. (2005): Effects of trichothecen mycotoxins on eukaryotic cells. *Food Additives and Contaminants*, 22, 369-378.
- ROCHE APPLIED SCIENCE (2003): Overview of LightCycler Quantification Methods. Technical Note, LC 10.
- RODEMANN, B.; BARTELS, G. (2004): *Fusarium*befall- Schadbild und Ausbreitung Maßnahmenpaket als Vorbeugestrategie. *Mais*, 32, 4-7.
- ROSSI, V.; LANGUASCO, L.; PATTORI, E.; GIOSUE, S. (2002): Dynamics of Airborne *Fusarium* Macroconidia in Wheat Fields Naturally Affected By Head Blight. *Journal of Plant Pathology*, 84, 53-64.
- ROTH, L.; FRANK, H.; KORMANN, K. (1990): Giftpilze Pilzgifte. Nikol, Hamburg.
- SARLIN, T.; YLI-MATTILA, T.; JESTOI, M.; RIZZO, A.; PAAVANEN-HUHTALA, S. (2006): Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 371-380.
- SCHAAFSMA, A.W.; TAMBURIC-ILINIC, L.; MILLER, J.D.; HOOKER, D.C. (2001): Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23, 279-285.
- SCHISLER, D.A.; KHAN, N.I.; BOEHM, M.J.; SLININGER, P.J. (2002): Greenhouse and Field Evaluation of Biological Control of *Fusarium* Head Blight on Durum Wheat. *Plant Disease*, 86, 1350-1356.
- SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. (2000): Effect of experimental treatment on house-keeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 46, 69-81.
- SCHNERR, H. (2002): Quantitativer Nachweis von Deoxynivalenol und Trichothecen-bildenden *Fusarium* spp. mit Biosensor und PCR in Getreide. Doktorarbeit, TU München, <http://tumb1.biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/ww/2002/schnerr.pdf>.
- SCHNERR, H.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. (2002): Correlation between DNA of trichothecene-producing *Fusarium* species and deoxynivalenol concentrations in wheat-samples. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 121-125.
- SCHOTS, A.; DEWEY, F.M.; OLIVER, R. (Hrsg.) (1994): Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, detection and Quantification. CAB International, Oxford UK.

- SEMIGHINI, C.P.; MARINS, M.; GOLDMAN, M.H.S.; GOLDMAN, G.H. (2002): Quantitative Analysis of the Relative Transcript Levels of ABC Transporter Atr Genes in *Aspergillus nidulans* by Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1351-1357.
- SHIM, W.-B.; WOLOSHUK, C.P. (2001): Regulation of Fuminosin B1 Biosynthesis and Conidiation in *Fusarium verticillioides* by a Cyclin-Like (C-Type) Gene, *FCCI*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1607-1612.
- SIRANIDOU, E.; KANG, Z.; BUCHENAUER, H. (2002): Studies on Symptom Development, Phenolic Compounds and Morphological Defence Response in Wheat Cultivars Differing in Resistance to *Fusarium* Head Blight. *Journal of Phytopathology*, 150, 200-208.
- SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. (2003): A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. *Plant Disease*, 87, 117-128.
- SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. (1999): Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175, 149-163.
- THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B.; HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E. (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75, 291-295.
- TOTH, B.; MESTERHAZY, A.; NICHOLSON, P.; TEREN, J.; VARGA, J. (2004): Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 587-599.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 1-12.
- VOIGT, CH.A.; SCHEIDT, B. VON; GACSER, A.; KASSNER, H.; LIEBEREI, R.; SCHÄFER, W.; SALOMON, S. (2007): Enhanced mycotoxin production of a lipase-deficient *Fusarium graminearum* mutant correlates to toxin-related gene expression. *European Journal of Plant Pathology*, 117, 1-12.
- WAALWIJK, C.; VAN DER HEIDE, R.; DE VRIES, I.; VAN DER LEE, T.; SCHOEN, C.; COSTRELE DE CORAINVILLE, G.; HÄUSER-HAHN, I.; KASTELEIN, P.; KÖHL, J.; LONNET, P.; DEMARQUET, T.; KEMA, G.H.J. (2004): Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 481-494.
- WANYOIKE, M.W.; ZHENSHENG, K.; BUCHENAUER, H. (2002): Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 803-810.
- WILHELM, K.P.; JONES, R.K. (2005): Meso- and Microscale Patterns of *Fusarium* Head Blight in Spring Wheat Fields in Minnesota. *Plant Disease*, 89, 474-479.

WINTON, L.M.; STONE, J.K.; WATRUD, L.S.; HANSEN, E.M. (2002): Simultaneous One-Tube Quantification of Host and Pathogen DNA with Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology*, 92, 112-116.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39, 75-85.

YI, C.; KAUL, H.-P.; KÜBLER, E.; SCHWADORF, K.; AUFHAMMER, W. (2001): Head Blight (*Fusarium graminearum*) and deoxynivalenol concentration in winter wheat as affected by pre-crop, soil tillage and nitrogen fertilization. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 108, 217-230.

Internetadressen für einige *Fusarium*-Prognosemodelle

FRANCL		http://mawg.cropdisease.com/
FORRER et al.	FUSAPROG	http://www.fusaprog.ch/
BRANDFAß et al.	FUS-OPT	http://ww2.zepp.info/cms/content/view/53/37/
EIBLMEIER et al.		http://www.lfl.bayern.de/ips/pflanzenschutz/hinweise/12410

Mündliche Auskünfte

GEISEN, ROLF (2007): Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL), Karlsruhe.

KREITMAYR, JOSEF (2005): Bay. Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), IAB, Freising.

ZIMMERMANN, GERD (2006): Bay. Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), IPZ, Freising.

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jean Charles Munch für die Übernahme dieses Amtes und das stets freundliche Interesse am Fortgang der Arbeit.

Bei Herrn Dr. Michael Schloter möchte ich mich für seine Diskussionsbereitschaft, seine stete Unterstützung und die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Luitgardis Seigner, von der Bay. Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), für die Überlassung des Themas, den regen Austausch an fachlichen Informationen, die große Unterstützung und die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Peter Büttner (LfL) und seinem Team danke ich für die Bereitstellung der Pilzkulturen, die mikroskopischen Untersuchungen und die tolle Zusammenarbeit.

Bei Frau Dr. Alexandra Hagn möchte ich für ihre Ideen und Ratschläge und das stets offene Ohr rund um die Promotion und bei Frau Dr. Dorothee Kaemmerer für ihre große Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit, das tolle Betriebsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft danke ich dem Laborteam von IPS 2c (LfL), ganz besonders Herrn Michael Hatzinger, Herrn Bernhard Enzinger, Herrn Markus Beck und auch Herrn Andre Bechtel, Herrn Peter Eiblmeier und Herrn Tobias Weber. Sie alle haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Christoph, der immer geduldig für mich da war, und meiner Familie für ihre stete Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliches

Name Astrid Bauer, geb. Peckl

Geburtsdatum 13.07.1976

Geburtsort Freising

Familienstand verheiratet

Ausbildung

1982 - 1986 Grundschule in Attenkirchen und Zolling

1986 - 1987 Hauptschule in Zolling

1987 - 1997 Camerloher-Gymnasium in Freising,
Allgemeine Hochschulreife

1997 - 2003 Studium der Gartenbauwissenschaften an der
TU-München/Weihenstephan,
Abschluss mit Diplom (Dipl. Ing. agr. (Univ))

Tätigkeit

2003 - 2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft/ Institut für Pflanzenschutz/ IPS 2c